

# **Charakterisierung organotypischer Hautmodelle für In-vitro-Permeationsuntersuchungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von Christine Hoffmann  
aus Peine

1. Referentin: Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann

2. Referent: Prof. Dr. M. Kietzmann

eingereicht am: 25.09.2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.12.2006

Druckjahr 2006

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2005) Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate, Pharmazie, 60 (5): 350-353

Niesner R, Peker B, Schlusche B, Gericke KH, Hoffmann C, Hahne D, Müller-Goymann CC (2005) 3D-resolved investigation of the pH gradient in artificial skin constructs by means of fluorescence lifetime imaging, Pharm Res 22 (7): 1079-87

### **Tagungsbeiträge**

Hoffmann C, Winkler A, Müller-Goymann CC (2002) Organotypische Hautäquivalente für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen (Poster), GD-Jahrestagung, Hamburg

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2002) Vergleich der Barriereigenschaften von humanem Stratum corneum und organotypischen Hautäquivalenten für Clindamycin (Poster), DPhG Jahrestagung, Berlin

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2003) Permeation behaviour of clindamycin from different commercial formulations through artificial skin constructs and human stratum corneum (Poster), APGI Symposium Skin and Formulation, Paris

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2004) The use of artificial skin constructs for permeation studies with pharmaceutical drugs (Poster), International Conference and Workshop on Cell Culture and In-Vitro Models for Drug Absorption and Delivery, Saarbrücken

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2004) Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate (Poster), Joint Meeting of the Austrian, Czech and German Pharmaceutical Societies, Regensburg

Hoffmann C, Müller-Goymann CC (2006) Permeation of ibuprofen through commercially available epidermis models and artificial skin constructs in contrast to excised human stratum corneum (Poster), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf



Für meine Ma



## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die nette und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. M. Kietzmann danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre und eine gute Zusammenarbeit sowie für die hilfreiche Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dagmar Hahne und Frau Britta Meier für ihre Unterstützung und Hilfe im Zellkulturlabor und bei den Permeationsuntersuchungen. Dr. Stephan Reichl danke ich für die Ermunterung zu diesem Thema, die Einführung in die Zellkultur und die fachlichen Diskussionen.

Dr. Ulrich Schäfer und Herrn Peter Meiers vom Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes in Saarbrücken danke ich sehr herzlich für die Lipidanalytik und ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich:

Prof. Dr. Christos Zouboulis von der Medizinische Fakultät Charité in Berlin für die Überlassung der Sebozytenzelllinie SZ 95.

Prof. N.E. Fusenig vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg für die freundliche Überlassung der HaCaT-Zelllinie.

Dr. P.-J. Flory aus der Plastische Chirurgie des Städtischen Klinikum Braunschweig, Holwedestrasse für die Hautspenden.

## Danksagung

---

dem Pathologischen Labor Dr. Parussis, insbesondere Frau Karin Solger, für die Anfertigung der Schnittpräparate.

der Galederma Laboratorium GmbH für die Fertigarzneimittel Basocin Akne Gel und Basocin Akne Lösung.

dem Institut für Füge- und Schweißtechnik, insbesondere Frau Andrea Blazejak, für die Unterstützung bei den REM-Aufnahmen.



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Die Haut</b>	<b>3</b>
2.1.1.	Funktion der Haut	3
2.1.2.	Morphologie der Haut	4
2.1.3.	Epidermis	5
2.1.3.1.	Stratum basale	6
2.1.3.2.	Stratum spinosum	7
2.1.3.3.	Stratum granulosum	7
2.1.3.4.	Stratum corneum	7
2.1.4.	Epidermale Symbionten	9
2.1.5.	Lipide der Epidermis	10
2.1.6.	Die Mikrostruktur des Stratum corneum	11
2.1.7.	Dermis	13
2.1.7.1.	Haare	14
2.1.7.2.	Talgdrüsen	15
2.1.8.	Subkutis	16
<b>2.2.</b>	<b>Physikalische Betrachtung der Haut</b>	<b>16</b>
2.2.1.	Elastische und viskoelastische Komponenten der Haut	17
<b>2.3.</b>	<b>Permeation von Substanzen nach dermalen Applikation</b>	<b>18</b>
<b>2.4.</b>	<b>Arzneistoffe zur dermalen Applikation</b>	<b>22</b>
2.4.1.	Ibuprofen	22
2.4.2.	Clindamycin	23
<b>2.5.</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>23</b>
2.5.1.	Kultivierung dermalen Zellen	24

2.5.2.	Dermale Zellkulturen	26
2.5.2.1.	Fibroblasten	26
2.5.2.2.	Keratinocyten	27
2.5.2.3.	Sebozyten	27
2.5.3.	Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung	28
2.5.4.	Zellkulturmodelle der menschlichen Haut und ihr Einsatz	29
<b>2.6.</b>	<b>Untersuchung der Arzneistoffaufnahme durch die Haut</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1.</b>	<b>Material</b>	<b>34</b>
3.1.1.	Verwendete Fertigarzneimittel	34
3.1.1.1.	Ibutop Creme	34
3.1.1.2.	Basocin Akne Gel/ Lösung	34
3.1.2.	Kommerzielle Hautmodelle	34
3.1.2.1.	AST-2000	34
3.1.2.2.	Skinethic	35
3.1.2.3.	Epiderm	35
<b>3.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
3.2.1.	Zellkulturen	35
3.2.1.1.	Humane Zellkulturen	35
3.2.1.1.1.	Humane dermale Fibroblasten (HDF)	35
3.2.1.1.2.	Keratinocytenzelllinie HaCaT	36
3.2.1.1.3.	Sebozytenzelllinie SZ 95	36
3.2.1.2.	Kultivierung und Subkultivierung	36
3.2.1.3.	Kryokonservierung der Zelllinien	37
3.2.1.4.	Mikroskopie	37
3.2.1.5.	Wachstumsverhalten	38
3.2.2.	Aufbau der humanen Hautmodelle	38
3.2.2.1.	Präparation des Rattenschwanzkollagens	38
3.2.2.2.	Herstellung der humanen Hautmodelle	38
3.2.2.3.	Kryokonservierung der Hautmodelle	41

3.2.3.	Charakterisierung der Hautmodelle	42
3.2.3.1.	Histologische Schnittpräparate	42
3.2.3.1.1.	Histochemische Färbung	42
3.2.3.2.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	42
3.2.3.3.	Quantifizierung der Hautlipide	43
3.2.3.4.	Immunhistologischer Laminin-Nachweis	44
3.2.3.5.	Rheologische Untersuchungen der Hautmodelle	45
3.2.3.6.	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	46
3.2.3.7.	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)	46
3.2.3.8.	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)	47
3.2.4.	Exzidiertes Stratum corneum	47
3.2.5.	Permeationsuntersuchungen	48
3.2.6.	HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe	49
<b>4.</b>	<b>Versuchsergebnisse und Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>4. 1.</b>	<b>Kultivierung und Charakterisierung der dermalen Zelllinien</b>	<b>50</b>
4.1.1.	Kultivierung der dermalen Zelllinien	50
4.1.1.1.	Fibroblasten	50
4.1.1.2.	Keratinocyten	50
4.1.1.3.	Sebozyten	52
4.1.2.	Wachstumsverhalten der dermalen Zelllinien	52
4.1.2.1.	Wachstumsverhalten der humanen dermalen Fibroblasten	53
4.1.2.2.	Wachstumsverhalten der HaCaT-Zelllinie	54
4.1.2.3.	Wachstumsverhalten der Sebozytenzelllinie SZ 95	54
4.1.3.	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der dermalen Zelllinien	55
<b>4.2.</b>	<b>Aufbau der humanen Hautmodelle</b>	<b>56</b>
4.2.1.	Hautmodell aus Fibroblasten und Keratinocyten	56
4.2.2.	Inkorporation der Sebozyten	58
4.2.3.	Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau der humanen Hautmodelle	58

<b>4.3.</b>	<b>Charakterisierung der organotypischen Hautmodelle</b>	<b>60</b>
4.3.1.	Immunhistologischer Nachweis der Basalmembrankomponente Laminin	60
4.3.2.	Oberflächenstrukturen des humanen Hautmodells	62
4.3.3.	Charakterisierung der humanen Hautmodelle mit Hilfe der DSC und der Röntgenstrukturanalyse	65
4.3.4.	Lipidnachweis in den humanen Hautmodellen	68
4.3.5.	Rheologische Untersuchung der Hautmodelle in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer	72
4.3.6.	Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der humanen Hautmodelle	80
<b>4.4.</b>	<b>Permeationsuntersuchungen</b>	<b>82</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>Permeationsuntersuchungen ibuprofenhaltiger Formulierungen durch humane Hautmodelle</b>	<b>83</b>
4.4.1.1.	Permeabilität der humanen Hautmodelle	84
4.4.1.2.	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle	84
4.4.1.3.	Einfluss der Kryokonservierung auf die Permeabilitätsbarriere der humanen Hautmodelle	88
4.4.1.4.	Einfluss der Sebozytenzelllinie SZ 95 auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle	89
4.4.1.5.	Einfluss unterschiedlicher Kollagenmatrices auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle	91
4.4.1.6.	Permeation durch kommerzielle Hautmodelle	93
4.4.1.7.	Zusammenfassende Diskussion zum Permeationsverhalten ibuprofenhaltiger Zubereitungen durch humane Hautmodelle	96
<b>4.4.2.</b>	<b>Permeationsuntersuchungen clindamycinhaltiger Formulierungen durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle</b>	<b>98</b>
4.4.2.1.	Einfluss der unterschiedlichen Grundlagen von Basocin Akne Gel und Lösung auf die Permeation von Clindamycin	98

4.4.2.2.	Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von clindamycinhaltigen Formulierungen durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle	101
<b>5.</b>	<b>Abschlussdiskussion</b>	<b>102</b>
5.1.	Kultivierung und Charakterisierung der humanen Zelllinien	102
5.2.	Aufbau und Charakterisierung der humanen Hautmodelle	103
5.3.	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Permeabilität und die strukturelle Beschaffenheit der humanen Hautmodelle	104
5.4.	Einfluss der lipidproduzierenden Sebozytenzelllinie SZ 95 auf den Lipidgehalt und die Permeabilität der Hautmodelle	106
5.5.	Vergleich der Permeationsbarriere der Hautmodelle mit kommerziellen Vollhaut- und Epidermismodellen	107
5.6.	Einfluss der Grundlage auf die Permeation von Clindamycin durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle	109
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>



## 1. Einleitung und Problemstellung

Damit auf der Haut applizierte Arzneistoffe lokal oder systemisch wirken können, müssen sie zuerst in tiefere Hautschichten penetrieren und schließlich auch durch die Haut permeieren. Die Permeabilität der Haut wird im wesentlichen durch die interzelluläre Lipidsubstanz des Stratum corneum, der äußeren Begrenzung der Epidermis, bestimmt. Diese Interzellularsubstanz enthält hauptsächlich Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren, die zusammen ein hochgeordnetes System aus lamellaren Schichten bilden.

In der Pharmazeutischen Technologie wird zur Bestimmung der Permeation eines Arzneistoffes aus einer dermalen Zubereitung häufig exzidierte Vollhaut, sowie davon isoliertes humanes Stratum corneum oder die hitzeseparierte Epidermis verwendet. Mit Hilfe dieser Barrieren wird zeitabhängig die Menge an Arzneistoff bestimmt, welche die Zubereitung verlässt und die Haut permeiert. So können unterschiedliche Permeationseigenschaften verschiedener Arzneistoffe und der Einfluss der Grundlage auf deren Permeation untersucht werden. Die Verwendung von exzidiierter Haut hat aber auch Nachteile. So besteht generell das Problem, dass das Spendermaterial nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht, und die Hautspenden verschiedener Spender deutliche Unterschiede in ihren Barriereigenschaften aufweisen. Die Barrierequalitäten sind abhängig vom Geschlecht, dem Alter, der Körperregion, aus der die Hautspende stammt aber auch vom Ernährungszustand des Spenders. Auch Tierhäute stehen als Alternative nur in begrenztem Umfang zur Verfügung, und es kann insbesondere aufgrund der wesentlich stärkeren Behaarung zu Veränderungen im Permeationsverhalten der Arzneistoffe kommen. Da außerdem die Vergleichbarkeit mit menschlicher Haut abhängig von der Tierhaut sehr unterschiedlich ist, sind seit einigen Jahren zahlreiche menschliche Epidermis- und Vollhautmodelle in reproduzierbarer Qualität kommerziell verfügbar.

In einer früheren Arbeit wurde in unserem Institut ein organotypisches Hautmodell entwickelt, das aus humanen dermalen Fibroblasten eingebettet in einem Kollagengel und der HaCaT-Zelllinie als Epidermisäquivalent besteht, und für Permeationsuntersuchungen eingesetzt [Specht, 1998].

Organotypische Hautmodelle weisen zwar im Vergleich zu exzidiertem Stratum corneum eine geringer ausgeprägte Barrierefunktion auf, was durch deutlich höhere Permeationsraten topischer Arzneistoffe gezeigt werden konnte, bieten aber insbesondere wegen der ausreichenden Verfügbarkeit und ihrer gleichbleibenden Qualität eine Alternative zu exzidiierter Haut.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- eine weiterführende Charakterisierung des organotypischen Hautmodells, aufgebaut aus humanen dermalen Fibroblasten in einem Kollagengel und der immortalisierten HaCaT-Zelllinie als Epidermisäquivalent, das in unserem Institut bereits in einer früheren Arbeit entwickelt wurde [Specht, 1998].
- die Erweiterung des bestehenden Hautmodells um die lipidproduzierende Sebozytenzelllinie SZ 95, sowie die Untersuchung des Einflusses dieser Zelllinie auf die Lipidzusammensetzung und die Barriereeigenschaften der Hautmodelle.
- ein Vergleich der Permeationsbarriere des Hautmodells mit kommerziell erhältlichen Vollhaut- und Epidermismodellen.
- die Untersuchung des Einflusses der Grundlage auf die Permeation von verschiedenen Arzneistoffen durch Hautmodelle und exzidiertes humanes Stratum corneum



## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1. Die Haut

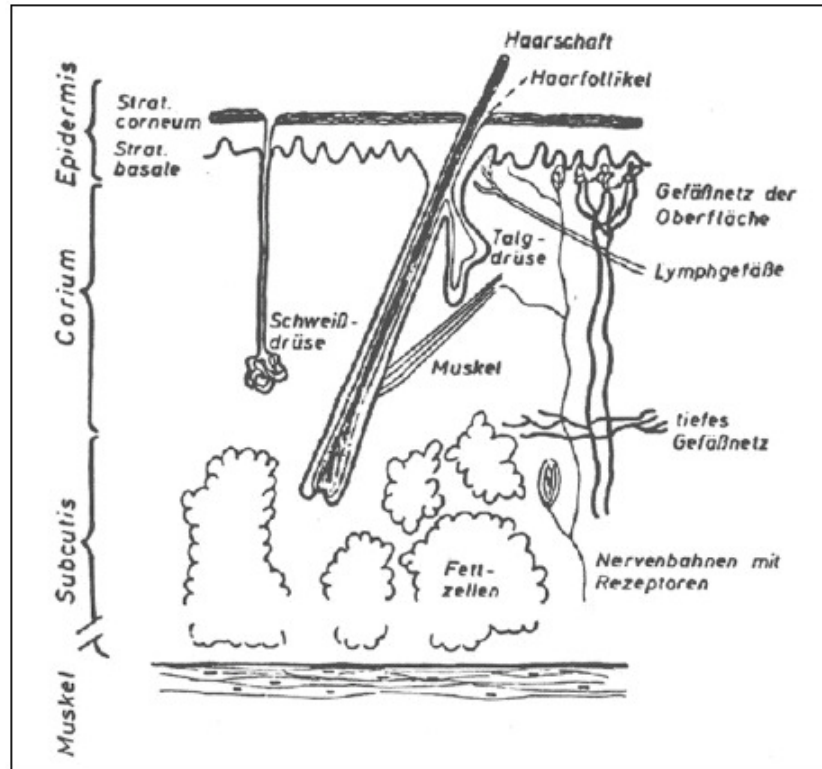


Abbildung 2.1: Aufbau der menschlichen Haut [Lippold, 1981]

#### 2.1.1. Funktion der Haut

Die Haut stellt die Abgrenzung des Körpers von seiner Umwelt dar und ist mit einer Fläche von ca.  $2 \text{ m}^2$  und einem Gewicht von bis zu 4 kg das größte Organ des menschlichen Körpers. Als wichtige Funktionen sind u.a. die Barrierefunktion, die Thermoregulation und die Funktion als Sinnesorgan zu nennen. Die Haut schützt somit vor chemischen, physikalischen und mechanischen Noxen und wehrt Mikroorganismen ab. Des weiteren ist sie an zahlreichen immunologischen Prozessen und am intermediären Stoffwechsel beteiligt.

Als äußere Barriere schützt die Haut den Körper zum einen vor dem Eindringen exogener Stoffe, so wie zum anderen auch vor zu starkem Austrocknen, indem der transepidermale Wasserverlust, die Wasserabgabe des Organismus an die Umgebung, auf ein geringes Maß reduziert wird. Eine gewisse physiologische Wasserverdunstung (Perspiratio insensibilis)

wird jedoch zugelassen. Über die Regulation der Hautgefäße und die Verdunstung des Schweißes wird außerdem eine Wärmeregulation erreicht, die durch das isolierende Fettgewebe zusätzlich verstärkt wirkt. Als Sinnesorgan können über zahlreiche spezielle Rezeptoren mechanische sowie thermische Reize und Schmerzreize übermittelt werden. Durch die Festigkeit insbesondere der Dermis werden Schädigungen durch scherende und reibende mechanische Kräfte in gewissen Grenzen abgewehrt. Zusätzlich werden Krafteinwirkungen durch das Fettgewebe der Subkutis gedämpft. Um den Organismus vor UV-Strahlung zu schützen, sind epidermale Melanozyten in der Lage schützendes Melanin zu produzieren.

### **2.1.2. Morphologie der Haut**

Die menschliche Haut gliedert sich in drei histologisch abgrenzbare Schichten, die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Corium oder Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut), wobei Epidermis und Dermis zusammenfassend als Kutis bezeichnet werden (Abbildung 2.1). Des weiteren befinden sich Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen in der Haut. Die Exkrete der Schweiß- und Talgdrüsen bilden auf der Haut einen Hydrolipidfilm. Durch bakterielle Lipasen kommt es auf der Hautoberfläche zur Spaltung der im Talg befindlichen Triglyceride mit der Folge, dass der pH-Wert des Hydrolipidfilms aufgrund der hohen Konzentration an freien Fettsäuren auf Werte um 5,5 - 6,5 sinkt. Dieser sogenannte Säureschutzmantel besitzt antibakterielle Wirksamkeit und schützt die Haut vor unterschiedlichen äußeren Einflüssen.

Die Subkutis ist ein Bindegewebe, in das in Abhängigkeit vom Ernährungszustand und der Lokalisation mehr oder weniger Fettgewebe eingelagert ist, so dass die Dicke sehr unterschiedlich sein kann. Sie dient als Kälteschutz und Energiespeicher.

Auf der Subkutis befindet sich die Dermis, die als Stütz- und Bindegewebe eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Beanspruchung aufweist. Dermis und Subkutis sind über die bindegewebigen Septen miteinander verbunden. Durch die unterschiedliche Dichte und Anordnung der Bindegewebsfasern wird die Dermis in das Stratum reticulare, das kräftige miteinander verbundene Kollagenfaserbündel und dazwischen liegende, netzartig verknüpfte, elastische Fasern enthält, und das der Epidermis benachbarte Stratum papillare unterteilt. In der Dermis befinden sich hauptsächlich Fibroblasten, die in eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen- und Elastinfasern sowie einer amorphen Grundsubstanz aus wasserbindenden Mucopolysacchariden eingebunden sind. Es kommen aber auch Zellen der Immunabwehr vor, wie Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten. Die Dermis enthält

außerdem Nervenbahnen und Gefäße, so dass die gefäßlose oberste Hautschicht, die Epidermis, durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden kann. Um die Nährstoffversorgung der Epidermis zu verbessern und einen besseren mechanischen Zusammenhalt zwischen Dermis und Epidermis zu erreichen, ist die Kontaktfläche zwischen der Epidermis und dem Stratum papillare durch zahlreiche Ausstülpungen stark vergrößert.

### 2.1.3. Epidermis

Die Epidermis ist die oberste Hautschicht und Trägerin der wichtigen Barrierefunktion. Sie ist ein geschichtetes, verhornendes Plattenepithel [Fritsch, 1990] und stellt ein holokrines Organ dar, da die Keratinozyten, die Hauptzellart der Epidermis, am Ende eines langen Differenzierungsprozesses in die toten kernlosen Korneozyten (Hornzellen) übergehen. Ihre Dicke beträgt in Abhängigkeit von der Körperstelle zwischen 40 µm und 1,5 mm und ist an mechanisch besonders stark beanspruchten Körperstellen wie z.B. Handflächen und Fußsohlen besonders groß.

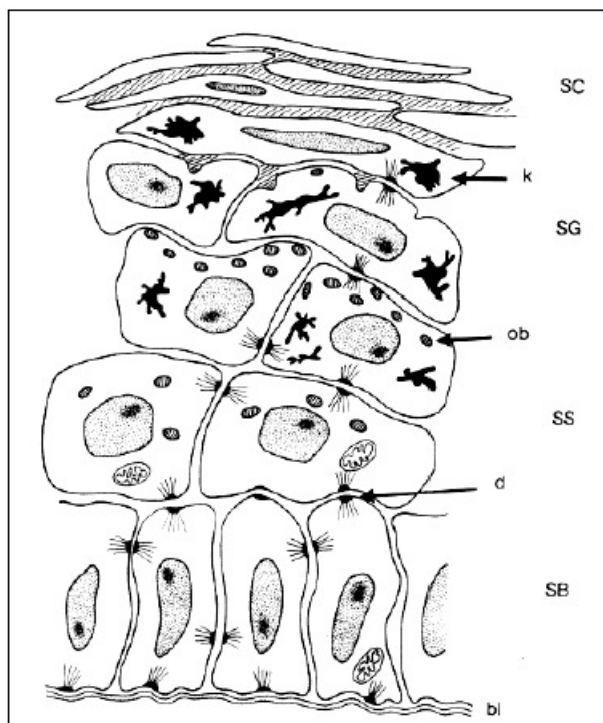


Abbildung 2.2: Aufbau der Epidermis; SC: Stratum corneum, SG: Stratum granulosum, SS: Stratum spinosum, SB: Stratum basale, k: Keratohyalingranula, ob: Odland Bodies, d: Desmosomen, bl: Basallamina [Fritsch, 1990]

Die Epidermis ist aus vier unterschiedlichen Schichten aufgebaut (Abbildung 2.2): Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und Stratum corneum (Hornschicht). An Handinnenflächen und an den Fußsohlen findet man zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum zusätzlich das Stratum lucidum (Glanzschicht).

Der Wassergehalt der Epidermis liegt in den lebenden Schichten im Bereich von 70 % und nimmt nach außen hin ab. Im Stratum corneum ist er auf ca. 10-20 % gesunken.

#### **2.1.3.1. Stratum basale**

Das Stratum basale ist die unterste Epidermiszellschicht. Sie ist einschichtig und die einzige Zellschicht, in der mitotische Prozesse ablaufen. Die zylindrischen Keratinozyten dieser Zellschicht besitzen eine Längsachse und sitzen der Basalmembran auf, der Verbindung zwischen Epidermis und Dermis. Dieser Bereich wird als dermoepidermale Junktionszone bezeichnet. Der Verlauf dieser Zone ist sägezahnartig, um einen höheren mechanischen Halt zu gewährleisten und durch die Oberflächenvergrößerung eine bessere Nährstoffversorgung der gefäßlosen Epidermis zu ermöglichen.

Die Keratinozyten der Basalzellschicht sind mit der Basalmembran durch Hemidesmosomen verbunden, einer Zellorganellart, die auch für die Anheftung der Keratinozyten untereinander verantwortlich ist, dort aber als Desmosomen bezeichnet wird.

Vom Stratum basale aus steigt ein ständiger Strom von Zellen in die höhergelegenen Zellschichten auf, verschiedene Differenzierungsprozesse finden statt, und am Ende dieser Prozesse steht der tote, völlig verhornte Keratinozyt, der Korneozyt. Die normale Passagezeit eines Keratinozyten beträgt von der Bildung bis zur Abschilferung im Stratum corneum ca. 28 Tage. Bestimmte pathologische Prozesse, wie z.B. die Psoriasis, können eine Verringerung dieser Zeit zur Folge haben.

Zur Regulation der Mitoserate der Keratinozyten der Basalzellschicht werden in differenzierten Keratinozyten der oberen Schichten Gewebshormone gebildet, sogenannte Chalone, die sich in verschiedene Unterarten gliedern lassen. Schädigungen der Epidermis haben eine Abnahme der Chalonkonzentration zur Folge, wodurch der repressive Effekt dieser Substanzen auf die Mitoseaktivität der Basalzellen entfällt. Sinnvoll ist dieses z.B. nach Traumen der Epidermis im Stadium der Wundheilung.

### **2.1.3.2. Stratum spinosum**

Die Stachelzellschicht besteht aus 2-5 Zellschichten. Hier findet eine Umorientierung der Längsachse der Zellen in horizontaler Richtung statt, wodurch sie abflachen. Außerdem geht an dieser Stelle die freie Beweglichkeit der Tonofibrillen verloren, da sie zu einer Masse zusammenschmelzen. In den Zellen sind zudem als Granula die im Golgi-Apparat gebildeten Odland bodies [Odland, 1960; Elias, 1981] zu erkennen, die einen Durchmesser von 0,1-0,3 µm haben und Enzyme, Glycoproteine und Lipide enthalten. Die letztgenannten Bestandteile der Granula sind als membranöse kontinuierliche Doppelschicht in Form abgeflachter Vesikel übereinandergestapelt und werden später für die Ausbildung der Lipidmatrix des Stratum corneums benötigt [Landmann, 1991].

### **2.1.3.3. Stratum granulosum**

In der Regel besteht das Stratum granulosum aus 1-5 Schichten abgeflachter Zellen. Die Körnerzellschicht hat ihren Namen durch die körnige Struktur der in den Zellen enthaltenen Keratohyalin granula, die von großer Bedeutung für die weitere Entstehung des Keratins sind. Diese Granula enthalten als Bestandteile eine Mischung aus histidin-, cystein- und prolinreichen Proteinen [Matoltsy und Matoltsy, 1970]. Das histidinreiche Profillagrin [Fritsch, 1990], das im Stratum spinosum synthetisiert wird, zerfällt im Stratum granulosum in Bruchstücke. Hierbei entsteht das hochreaktive Fillagrin. Durch das Fillagrin wird eine irreversible Aggregation und Polymerisation der Tonofilamente ausgelöst, so dass über eine Stabilisierung durch Disulfidbrücken das für die Korneozyten typische Keratinnetz entsteht. Parallel hierzu werden die Zellorganellen durch proteolytische Enzyme aufgelöst und der Inhalt der Odland bodies durch Exozytose in den Interzellularraum freigesetzt [Landmann, 1991].

### **2.1.3.4. Stratum corneum**

Die stark abgeflachten toten Korneozyten bilden zusammen mit einer Lipidmatrix geordneter Struktur das Stratum corneum, das als die eigentliche Schutzschicht der Haut angesehen und in seiner Struktur mit einem Backstein-Mörtel-Modell (Abbildung 2.3) verglichen wird [Elias, 1983]. Das Stratum corneum ist die wichtigste Barriere der Haut, um den transepidermalen Wasserverlust zu reduzieren und das Eindringen von exogenen Stoffen in die Haut bzw. den

Körper zu verhindern. Das Stratum corneum besteht aus etwa 15-20 Lagen Korneozyten, die quervernetztes Keratin, ein filamentöses Protein in einer strukturlosen Proteinmatrix, beinhalten [Fritsch, 1990; Forslind, 1994]. Im unhydratisierten Zustand beträgt die Dicke des Stratum corneums ca. 10  $\mu\text{m}$ , kann aber an stark beanspruchten Hautstellen wie Handflächen oder Fußsohlen wesentlich dicker sein [Barry, 1983].

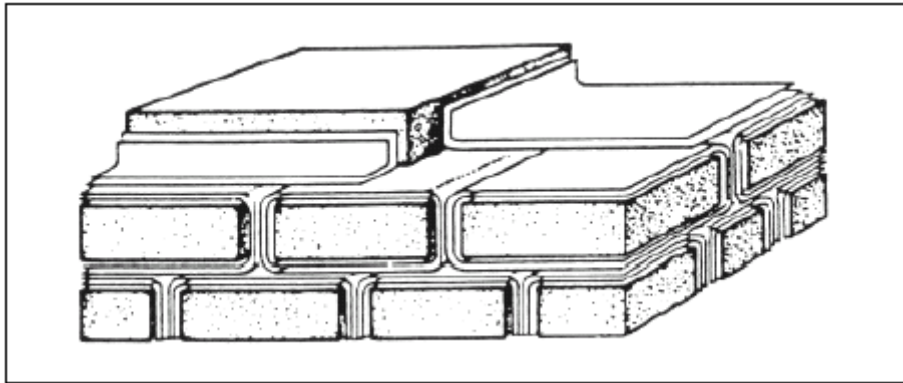


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Stratum corneum [Landmann, 1991]

Der Aufbau der Korneozyten unterscheidet sich wesentlich von allen restlichen Körperzellen, da im Laufe der Keratinisierung sämtliche Zellorganellen aufgelöst werden. Im Inneren befinden sich quervernetzte Keratinfibrillen, die in eine Matrix aus cystin- und prolinreichen Proteinen, die in den Keratohyalin granula gebildet wurden, eingelagert sind. Anstatt der sonst üblichen Plasmamembran befindet sich um die Korneozyten eine sogenannte Horn-Hülle (cornified envelope). Dabei handelt es sich um eine 7-15 nm breite Barriere aus quervernetzten Keratinmakrofibrillen, an die Lipide kovalent gebunden sind, und die der Zellmembran von innen aufliegt.

Die Undurchlässigkeit des Stratum corneums für Wasser entsteht durch die Kombination der Verhornung der Korneozyten und deren Einbettung in eine Lipidmatrix. Die Bestandteile der hydrophoben Lipidschichten des Stratum corneums werden in den Odland bodies gebildet [Potts und Francoeur, 1991] und im Laufe der Differenzierung durch Exozytose an den Interzellularraum abgegeben. Phospholipide, die die Hauptbestandteile menschlicher Zellmembranen darstellen, spielen an der Gesamtheit der Lipidmasse nur eine untergeordnete Rolle. Auch Triglyceride kommen nur in Spuren vor [Elias, 1990]. In größeren Mengen sind statt dessen Ceramide (41 %), Cholesterol (27 %) und Cholesterolester (10 %) und freie Fettsäuren (9 %) zu finden [Wertz und Downing, 1989], wobei die Angaben von Autor zu

Autor unterschiedlich sein können. Der Fettsäureanteil der Ceramide ist lang und unverzweigt. Als Hauptbestandteil der Lipide sind sie wichtig für die Bildung einer hochgeordneten Membran zum Schutz vor äußeren Einflüssen [Schurer und Elias, 1991].

Die Lipide bilden im Interzellularbereich des Stratum corneums lamellare Doppelschichten aus, dabei steht für die Lipidmasse 20-30 % des Volumens der Hornschicht zur Verfügung [Elias und Leventhal, 1979]. In Hinblick auf die Fluidität und Permeabilität unterscheiden sich diese Lipiddoppelschichten von denen der Biomembranen erheblich. Die lamellaren Strukturen sind parallel zur Hautoberfläche ausgerichtet [Garson et al., 1991] und besitzen aufgrund ihrer Zusammensetzung eine besondere Stabilität. Die lateralen Wasserstoffbrückenbindungen der Ceramide, die verglichen mit anderen Biomembranen zu einem sehr hohen Anteil vorliegen, stabilisieren die Struktur und festigen den äußeren Bereich der Doppelschicht. Es wird auch vermutet, dass die Ausbildung der Lipiddoppelschicht durch einen ausreichenden Anteil an amphiphilen Verbindungen wie Cholesterolsulfat gefördert wird [Williams und Elias, 1987]. Das Sterolgerüst des Cholesterols sorgt durch seine Steifigkeit für eine regelmäßige Anordnung von benachbarten Fettsäuren. Die gesättigten Fettsäuren fördern durch das Fehlen von Verzweigungen eine höhere molekulare Ordnung, die durch eine Zunahme der Kettenlänge begünstigt wird [Landmann, 1991].

Eine Störung der Lipidstruktur durch Veränderung der Lipidzusammensetzung oder eine Konformationsänderung in der Alkylkette der Lipide, z.B. als Folge einer Krankheit, verschlechtern die Barriereeigenschaft der Haut und führen außerdem zu einer erhöhten Wasserdurchlässigkeit [Imakova et al., 1991; Golden et al., 1987a; Golden et al., 1987b]. Im Vergleich zu den flüssigkristallinen Phospholipiden der Biomembranen wird für die Stratum corneum Lipide das Vorliegen von Kristall-/Gelphasen vorgeschlagen, die von einer flüssigkristallinen Phase bestehend aus relativ kurzkettigen Lipiden umgeben sind [Forslind, 1994].

#### **2.1.4. Epidermale Symbionten**

Die Epidermis enthält zu etwa 90 % Keratinozyten, die restlichen 10 % nehmen andere Zellarten ein, die in der Haut besondere Funktionen zu erfüllen haben.

Melanozyten sind verantwortlich für den UV-Schutz der Haut. Sie liegen direkt dem Stratum basale auf und schützen durch die Synthese des Pigmentes Melanin den Organismus vor UV-

Schädigungen. Ein Melanozyt versorgt auf dendritischem Wege etwa 30 weitere Keratinozyten.

Als weitere Zellart befinden sich hauptsächlich im Stratum basale die Langerhans-Zellen. Sie bilden mit ihren dendritischen Ausläufern zwischen den Keratinozyten ein hochspezialisiertes Antigeninformationssystem. Es handelt sich um Klasse II Alloantigen tragende Leukozyten, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Ihre Funktion besteht darin, durch Antigenpräsentation eine antigenspezifische Proliferation sensibilisierender T-Zellen auszulösen [Stingl et al., 1981]. Des weiteren vermitteln sie Transplantatabstoßungsreaktionen und die allergische Kontaktdermatitis [Fritsch, 1985]. Die Regulation ihrer Funktion erfolgt sowohl durch zahlreiche exogene Faktoren (z.B. UV-Bestrahlung, Glucocorticosteroide) als auch durch Faktoren, die von Keratinozyten produziert werden (Zytokine) [Neubert et al., 2001].

Merkel-Zellen sind als Einzelzellen oder in Gruppen zwischen den Keratinozyten des Stratum basale angeordnet. Es handelt sich um Sinneszellen neuroektodermaler Herkunft, deren Funktion in der Weiterleitung von mechanischen Reizen liegt. Eine Merkel-Zelle und eine Nervenendigung bilden einen Komplex, der als Merkel-Scheibe bezeichnet wird [Fritsch, 1985]. Ebenso wird eine Beteiligung an Prozessen von Differenzierung und Wachstum diskutiert [Neubert et al., 2001].

### **2.1.5. Lipide der Epidermis**

In Tabelle 2.1 ist die Lipidzusammensetzung der unterschiedlichen Schichten der Epidermis zusammengefasst. Wie schon in Abschnitt 2.1.3.4 beschrieben wird, geben verschiedene Autoren variierende Lipidzusammensetzungen des Stratum corneums an.

Die Zellen des Stratum basale und des Stratum granulosum zeigen eine komplexe Lipidzusammensetzung mit Phospholipiden als dominierende Komponente, die allen Zellen mit subzellulären Organellen gemeinsam ist. Im Stratum corneum überwiegt der Einfluss der Odland bodies auf die Lipidzusammensetzung, so dass die Konzentration an Phospholipiden drastisch verringert ist. In den verhornten Zelllagen sind die Glycosylceramide und Phospholipide vollständig verschwunden. Gleichzeitig ist ein Anstieg an Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol festzustellen. Hinsichtlich des Gehalts an Triglyceriden gilt es anzumerken, dass in der Literatur sehr unterschiedliche Mengenangaben gefunden werden. Es gilt zu berücksichtigen, dass die in der Haut vorkommenden Talgdrüsen eine ständige „Kontamination“ des Stratum corneum mit Triglyceriden, die ja die Hauptlipidkomponente



der Talgdrüsen darstellt, verursachen [Wertz, 1996]. Elias et al. (1983) berichten von regionalen Schwankungen im Triglyceridgehalt exzidiierter Häute und führen dies auf Verunreinigungen mit subkutanen Fettgewebe zurück. Diese Vermutung wurde von Hedberg et al. (1988) bei der Untersuchung von Schweinehäuten belegt. Während sich im Stratum corneum von exzidierten Häuten bis zu 46 % an Triglyceriden fanden, konnte im Stratum corneum, das von lebenden Schweinen gewonnenen wurde, lediglich ein Triglyceridgehalt von 1-10 % ermittelt werden.

Die Lipide weisen im genuinen Zustand eine sehr hohe Ordnung auf. Dieser Ordnungszustand ist die Voraussetzung für die Barrierefunktion der interzellulären Lipide.

*Tabelle 2.1: Lipidzusammensetzung [% m/m] der lebenden Epidermis [Lampe et al., 1983] und von verschiedenen Autoren angegebene Zusammensetzung für Stratum corneum Lipide*

<b>Lipidklasse</b>	<b>Stratum basale</b>	<b>Stratum granulosum</b>	<b>Stratum corneum [Lampe, 1983]</b>	<b>Stratum corneum [Elias, 1990]</b>	<b>Stratum corneum [Wertz, 1996]</b>
<b><u>1. polare Lipide</u></b>					
<b>Phospholipide</b>	44,5	25,3	4,9	Spuren	--
<b>Cholesterolsulfat</b>	2,4	5,5	1,5	4,0	--
<b><u>2. neutrale Lipide</u></b>					
<b>Cholesterol</b>	11,2	11,5	14,0	20,0	25,0
<b>Fr. Fettsäuren</b>	7,0	9,2	19,3	25,0	10,0-15,0
<b>Triglyceride</b>	12,4	24,7	25,2	Spuren	Spuren
<b>Sterole/Wachse</b>	5,3	4,7	5,4	5,0	5,0
<b>Squalen</b>	4,9	4,6	4,8	4,0	--
<b>n-Alkane</b>	3,9	3,8	6,1	4,0	--
<b><u>3. Sphingolipide</u></b>					
<b>Glycosylceramide</b>	3,5	5,8	Spuren	--	--
<b>Ceramide</b>	3,8	11,7	18,1	35	50

### **2.1.6. Die Mikrostruktur des Stratum corneum**

Die Mikrostruktur der Haut kann mit thermo- und röntgenanalytischen Methoden untersucht werden, um Veränderungen und eine damit verbundene erhöhte Permeabilität des Stratum corneums zu erkennen.

Bei der thermoanalytischen Untersuchung des Stratum corneums können im Idealfall vier endotherme Phasenübergänge mit geringer Enthalpie im Bereich von 30-105 °C (Abbildung 2.4) registriert werden [Bouwstra et al., 1991a]. Die Peaks T1 bei 30-40 °C und T2 bei 65-70 °C werden als reine Lipidpeaks angesehen, da sie thermisch reversibel sind und nach einer Lipidextraktion verschwinden [Golden et al., 1987a; Bouwstra et al., 1991a]. Peak T1 ist klein und nicht immer detektierbar. Für sein Vorliegen werden voneinander abweichende Begründungen genannt. Während einige Autoren das Schmelzen von Sebumlipiden als Grund anführen [Barry, 1987], deuten temperaturabhängige Röntgenuntersuchungen auf die Umwandlung der orthorhombischen Anordnung der Lipidketten in eine hexagonale hin [Bouwstra et al., 1991b, Bouwstra et al., 1992]. Peak T2 wird als eine Gel-Flüssigkeitsumwandlung der Lipidlamellen [Bouwstra et al., 1991a] beschrieben. Der dritte Phasenübergang bei 75-85 °C zeigt vermutlich die Umwandlung von Lipiden an, die an Proteine gebunden sind. Diese Schlussfolgerung ergibt sich durch die Reversibilität des Peaks, wenn die Probe nicht über die Denaturierungstemperatur des Keratins von 105 °C erhitzt wird, und die weitere, wenn auch schwächere, Existenz nach Lipidextraktion. Die Denaturierung des interzellulären Keratins bei ca. 105 °C hat den vierten Übergang zur Folge, der irreversibel ist und nur bei einem Wassergehalt von mehr als 15 % gefunden werden kann [Bouwstra et al., 1991a].

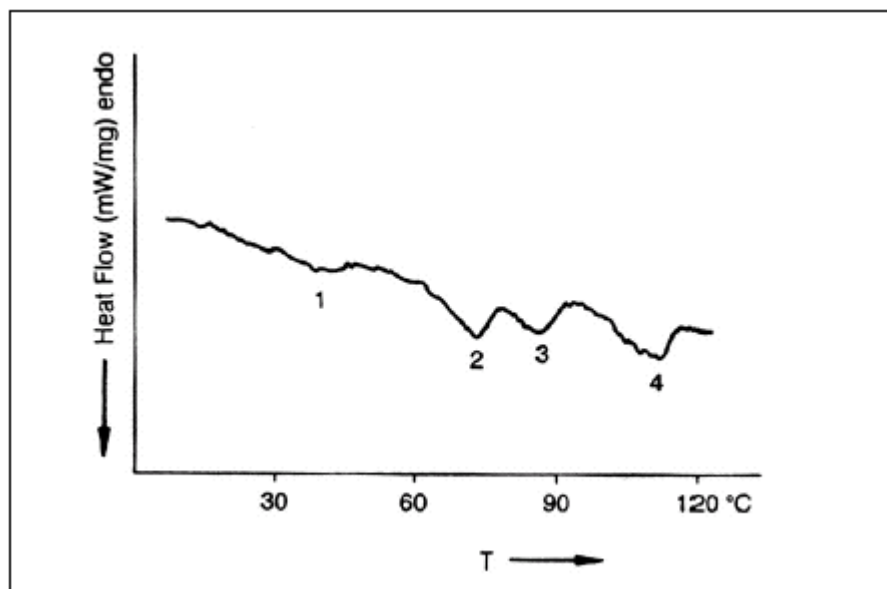


Abbildung 2.4: Thermogramm für exzidiertes humanes Stratum corneum [Bouwstra et al., 1993]

Röntgenkleinwinkeluntersuchungen zeigen, dass das Stratum corneum zwei unterschiedliche Lamellarphasen enthalten muss, die einen Netzebenenabstand von 6,4 und 13,4 nm haben und nebeneinander vorliegen [Bouwstra et al., 1991a; Bouwstra et al., 1992].

Röntgenweitwinkeluntersuchungen mit Stratum corneum weisen für die Nahordnung der Lipide zwei scharfe Interferenzen bei ca. 0,38 und 0,42 nm sowie zwei diffuse Halos bei 0,46 und 0,98 nm auf [Garson et al., 1991; Bouwstra et al., 1992; Cornwell et al., 1994]. Die beiden erstgenannten Interferenzen, deren Angaben je nach Literaturstelle leicht variieren können, stehen vermutlich für kristalline Lipide [Small, 1986]. Die Interferenzen bei 0,38 und 0,42 nm sind charakteristisch für eine orthorhombische senkrechte Anordnung. Außerdem weist die Interferenz bei 0,42 nm auf das gleichzeitige Auftreten einer Gel-Phase mit hexagonaler Anordnung hin, deren Packung etwas lockerer ist als im kristallinen Zustand [Bouwstra et al., 1992]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Lipide im Stratum corneum nebeneinander in einer Kristall- und Gelphase vorliegen, z.B. durch eine laterale Phasentrennung innerhalb der Doppelschicht [Cornwell et al., 1994]. Da diese Interferenz auch nach einer Lipidextraktion in geschwächter Form noch zu erkennen ist, scheint eine Beteiligung von Lipiden, die an Proteinen des cornified envelope gebunden sind, möglich. Für das Vorhandensein der beiden Halos bei 0,98 und 0,46 nm, die auch nach einer Lipidextraktion noch zu erkennen sind, ist die Anwesenheit von Keratin in den Korneozyten verantwortlich. Zusätzlich enthält der letztgenannte Halo eine Interferenz, welche durch die flüssigkristalline Anordnung der Lipide in der Lamellarphase bedingt ist [Bouwstra et al., 1992].

### **2.1.7. Dermis**

Die Dermis ist ein fibroelastisches Bindegewebe, das sich durch eine hohe Resistenz gegenüber mechanischer Beanspruchung auszeichnet. Als Hauptzellart kommen in der Dermis Fibroblasten vor, aber auch Makrophagen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Die Zellen sind in eine Matrixsubstanz aus verschiedenen Stütz- und Strukturproteinen wie dem Kollagen eingebettet. Das Kollagen liegt in der Dermis in Form von Kollagenfaserbündeln mit einer Tendenz zur Längsorientierung vor, wobei das Kollagen des Typs I vorherrscht. Kollagen wird durch die Fibroblasten in der Dermis gebildet und als lösliches Prokollagen in den Extrazellulärraum abgegeben. Dort findet eine enzymatische Veränderung statt, mit der Folge, dass das Kollagenmolekül seine Löslichkeit verliert und spontan zu Fibrillen aggregiert, die durch cross-links mit Nachbarmolekülen stabilisiert

werden. Durch eine ebenfalls in Fibroblasten synthetisierte Kollagenase wird das Kollagen extrazellulär abgebaut, wobei der Turnover des Kollagengewebes sehr langsam ist, da die Kollagenase das langsamste Enzym des Säugetierorganismus darstellt [Fritsch, 1990].

Durch die in der Dermis vorhandenen Gefäße wird die Epidermis durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt.

### 2.1.7.1. Haare

Haare sind biegsame und zugfeste Hornfäden mit einer Dicke von 5-200  $\mu\text{m}$ . Der aus der Haut herausragende Teil des Haares wird als Haarschaft bezeichnet, während der in der Haut befindliche Teil als Haarwurzel bezeichnet wird. Diese steckt in einer Einsenkung des Oberflächenepithels, der Haartasche, und ist an ihrem unteren Ende, wo sie der für die Ernährung verantwortlichen Haarpapille aufsitzt, zur Haarzwiebel verdickt. Diese enthält undifferenzierte Matrixzellen und Melanozyten. Von ihr aus wächst das Haar täglich etwa 0,4 mm. Man unterscheidet die bis in die Subkutis reichenden Terminalhaarfollikel, die ein dickes Haar bilden, und die im Corium endenden Vellushaarfollikel, aus welchen kleine, dünne Haare hervorgehen.

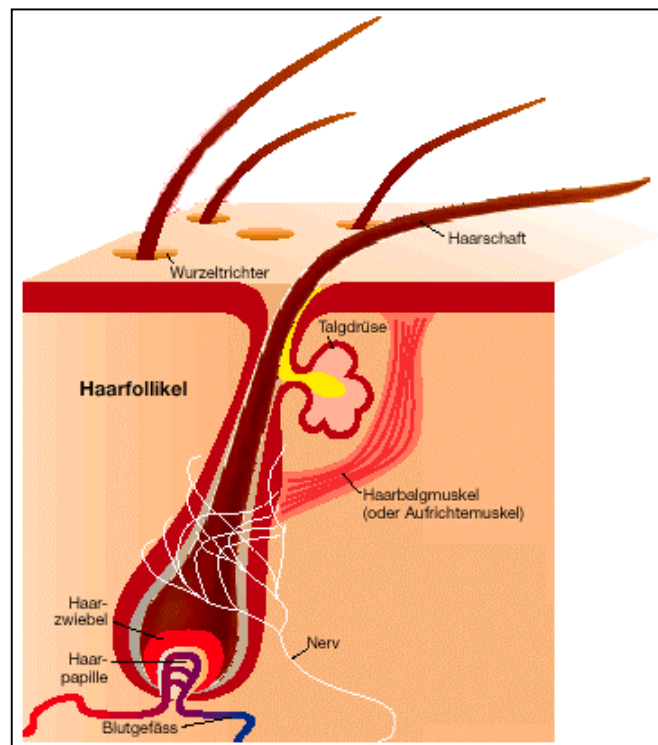


Abbildung 2.5: Aufbau eines Haarfollikels [<http://www.infohair.ch>]

### 2.1.7.2. Talgdrüsen

Die Talgdrüsen (Abbildung 2.6) liegen in der Dermis und sind, mit Ausnahme von Hand- und Fußflächen, über den ganzen Körper verteilt. Sie sind fast immer mit dem Haarfollikel verbunden und entleeren ihren Inhalt (Sebum) durch Drüseneschläuche in den Follikel. Da sie meist dem Epithel der Haaranlagen entstammen und in den Haarfollikel (Abbildung 2.5) münden, werden sie als Haarbalgdrüsen bezeichnet. Nicht an Haare gebundene, sogenannte freie Talgdrüsen kommen an der Nasenöffnung, am Lippenrot und im Genitalbereich vor.

Die Talgdrüsen zeigen einen uni- oder multilobulären Aufbau, d.h. dass mehrere Drüsensegmente blattförmig zusammengeschlossen sind und ihr Sekret in einen gemeinsamen Ausführungsgang abgeben. Ihr Sekretionstyp ist holokrin. Die Zellen werden im Zuge ihrer Wanderung zum Ausführungsgang teilweise selbst zu Sekret, d.h. die Zellen der Talgdrüsen lösen sich auf und stellen Teile des Talgs dar [Herrmann und Trinkkeller, 1999].

Der Talg, als dessen charakteristischer Bestandteil das Squalen zu nennen ist, wird an der Haartasche entleert, gelangt von dort an die Oberfläche der Haut, überzieht diese und die Haare mit einer schützenden Fettschicht und sorgt so für Geschmeidigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Wasser und toxischen Umweltsubstanzen.

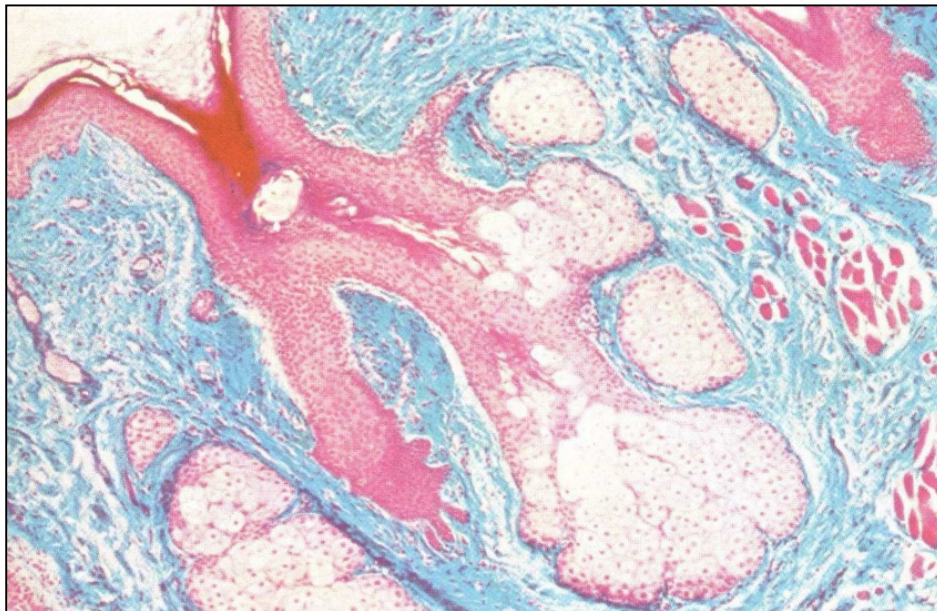


Abbildung 2.6: Holokrine Talgdrüse, Azan-Färbung, 60-fach vergrößert [Welsch, 1997]

Die Talgdrüsen weisen zwei Zelltypen auf, die „Sebozyten“ und die „Zellen der Ausführungsgänge“. In den Sebozyten, die in der Basalzellschicht produziert werden, findet die Synthese des Sebums statt. Die Basalzellschicht befindet sich am äußersten Rand der

Talgdrüsenzellen, steht in Kontakt mit dem umgebenden Bindegewebe und ist vergleichbar mit der epidermalen Basalmembran. Aus der kleinen flachen Basalzelle, die elektronenmikroskopisch schon Fetttröpfchen enthält, entwickelt sich insbesondere durch Lipidzunahme ein bis zu 150-mal so großer Sebozyt, der mehr als 50 einzelne durch das Zytoplasma getrennte Lipidvakuolen enthält. Zum Ende der Zellreifung wird der Zellkern pyknotisch, er löst sich auf, die Zelle ruptiert und Sebumlipide werden freigesetzt. Eine Zunahme der Zellgröße, die Ansammlung von Lipiden und eine veränderte Antigenexpression sind Merkmale der Differenzierung von Sebozyten in vivo [Zouboulis et al., 1994].

Die Hautoberflächenlipide unterscheiden sich von den Lipiden der Sebozyten, da die Epidermis eine weitere Lipidquelle darstellt und der Talg, so wie er sich im Ausführungsgang befindet, u.a. bakteriellen Stoffwechselprozessen ausgesetzt ist. Der eigentliche Hauttalg besteht hauptsächlich aus Triglyceriden, Squalen und Wachsesteren [Nikkari, 1974; Stewart und Downing, 1991; Strauss et al., 1991].

Die Zellen der Ausführungsgänge nehmen eine Zwischenstellung zwischen Sebozyten und Keratinozyten ein. Zum einen enthalten sie Lipidtröpfchen und zum anderen zeigen sie auch Merkmale der Keratinisierung.

### **2.1.8. Subkutis**

Das Unterhautfettgewebe sitzt direkt den Faszien auf. Bindegewebige Septen der Dermis dringen tief in die Subkutis ein und führen zu einer Verankerung mit der Dermis.

Die Subkutis ist verantwortlich für die Thermoregulation des Körpers, da die Fettschichten isolierend wirken. Außerdem stellt sie durch den hohen Fettanteil auch ein Energiereservoir für den Körper dar.

## **2.2. Physikalische Betrachtung der Haut**

Die biomechanischen Eigenschaften der Haut sind nicht nur von ihrer Struktur, sondern in starkem Maße auch vom Gefüge, d.h. der Größe und Form der Zellen, dem Zusammenhalt der einzelnen Schichten und dem komplexen Zusammenspiel innerer Faserstrukturen sowie der Matrix abhängig [Wilhelmi et al., 1998; Hsu et al., 1994; Sasaki und Odajima, 1994; Purslow et al., 1998]. Wichtige biomechanische Eigenschaften sind die Verformbarkeit und die Festigkeit [Bargel, Schulze, 1994].

### **2.2.1. Elastische und viskoelastische Komponenten der Haut**

Die menschliche Haut (s. Abschnitt 2.1.) ist multifunktionell und hat eine extrem komplexe Struktur. Sie ist mehrschichtig mit eingefalteten bzw. gewundenen, häufig unscharfen Grenzen zwischen den einzelnen Schichten, und ihre Eigenschaften sind richtungsabhängig [Edwards und Marks, 1995].

Es besteht weitgehende Übereinstimmung darüber, dass die biomechanischen Eigenschaften der Haut in erster Linie von der Dermis abhängen [Cua et al., 1990; Elsner et al., 1990]. Ihr Zustand wird maßgeblich durch die intra- und intermolekulare Verknüpfung von kollagenen, elastischen und retikulären Fasern, eingebettet in einer viskosen, amorphen Grundsubstanz (Matrix), bestimmt. Für die gesamte Hautmechanik scheint dabei die Epidermis eine untergeordnete Rolle zu spielen [Daly und Odland, 1979].

Der Aufbau der Epidermis ist in Abschnitt 2.1.3. ausführlich beschrieben. Durch die Anwesenheit faserartiger Keratine (Skleroproteine) ist sie widerstandsfähig, zäh und elastisch federnd [Christensen et al., 1977]. Die Anpassung an biomechanische Belastungen wird vermutlich durch die Bildung eines suprazellulären Stützgewebes gewährleistet. Die Viskoelastizität innerhalb der Epidermis ist ebenfalls mit der Anwesenheit von Wasser bzw. Schweiß assoziiert [Serban et al., 1986], so dass der Hydratationszustand Einfluss auf ihre biomechanischen Eigenschaften nimmt. Durch die geringe Dicke der Oberhaut und der Verzahnung mit dem Stratum papillare ist bei Zugbelastungen von einer Übertragung auf unterliegende Schichten auszugehen. Aus diesem Grund ist es letztlich schwer, die Einflüsse der Epidermis von denjenigen der Dermis zu trennen.

Der Aufbau der Dermis ist in Abschnitt 2.1.7. beschrieben. Hsu et al. (1994) vertreten die Ansicht, dass die viskoelastischen Eigenschaften des kollagenen Fasernetzwerkes der Haut von den Interaktionen zwischen den makromolekularen Komponenten in der extrazellulären Matrix beeinflusst werden. Die Matrix hat die Eigenschaften eines Kolloids, d.h. sie ist wasserunlöslich, kann aber Wasser binden und stellt ein viskoses Material dar [Gütt, 1998]. Von den viskosen Anteilen der Viskoelastizität wird angenommen, dass sie in jedem Fall von den Komponenten der amorphen Grundsubstanz abhängig sind [Daly und Odland, 1979; Vogel, 1981]. Die Matrix beinhaltet Glukosaminoglykane, die, teilweise an Peptidketten geknüpft, die Proteoglykane (Makromoleküle) bilden, welche insbesondere durch ihre Wasserbindungsfähigkeit für die Hydratation verantwortlich sind [Daly und Odland, 1979]. Bei Änderungen im Gleichgewicht der Matrix verändern sich entsprechend die viskoelastischen Eigenschaften der Haut [Wilhelmi et al., 1998].

Die Kollagenfasern der Dermis stellen ein relativ dehnsteifes, fibröses Material von außerordentlich hoher Reiß- und Zugfestigkeit dar. Reiß- und Zugfestigkeit werden durch die Grundeinheit des Kollagens, der aus festen Bindungen bestehenden Trippel-Polypeptidkette, gebildet. Das rheologische Verhalten der Kollagenfasern ist viskoelastisch [Wilhelmi et al., 1998]. Ist die Haut entspannt, so liegen die Kollagenfaserbündel als lockeres, schlaffes und gewelltes Netzwerk vor und sind vorerst nicht in der Lage, Spannungen zu übertragen [Wilhelmi et al., 1998]. Sobald das Gewebe jedoch eine Dehnung erfährt, setzt eine gerade Ausrichtung und Streckung dieser Fasern in Richtung der Hauptdehnung ein. Infolgedessen entwellen sich die Kollagenfasern. Steigt die Zugspannung, werden zunehmend mehr Kollagenfasern rekrutiert und gedehnt, so dass sie zur Übertragung der Spannung beitragen [Cua et al., 1990]. Parallel dazu steigt die Widerstandskraft, die proportional zur Spannung ist, und erreicht ihr Maximum bei vollständiger Dehnung der Fasern.

Durch die außerordentliche Komplexität des viskoelastischen Hautgewebes können die biomechanischen Phänomene bis dato noch nicht eindeutig den einzelnen Hautkompartimenten zugeschrieben werden. Aus bisherigen Untersuchungen kann vorerst folgendes festgestellt werden:

- die Elastizität wird in erster Linie durch Kollagen und elastische Fasern,
- die Viskosität durch die innere Reibung der
  - Bindegewebszellen untereinander,
  - Zellen und Kollagenbündel,
  - Kollagenfasern innerhalb der Bündel untereinander und
  - Komponenten der dermalen Grundsubstanz

repräsentiert. Daneben leistet die Epidermis einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag am Reibungswiderstand. Ihr Gehalt an Feuchtigkeit und an Lipiden beeinflusst den viskosen Widerstand gegenüber einer Verformung [Gütt, 1998].

### **2.3. Permeation von Substanzen nach dermalen Applikation**

Prinzipiell gehört es zu den Aufgaben des Stratum corneums das Eindringen exogener Substanzen zu verhindern. Dem gegenüber steht allerdings das Interesse des Pharmazeuten Wirkstoffe dermal zu applizieren. Die dermale Applikation von Arzneistoffen kann genutzt werden, um eine lokale oder systemische Wirkung von Arzneistoffen zu erreichen. Um systemisch wirken zu können, muss der applizierte Wirkstoff zunächst das Stratum corneum permeieren, anschließend durch Penetration die tiefere Hautschicht der Dermis erreichen und



in das Gefäßnetz aufgenommen werden [Ziegenmeyer, 1989]. Nach dieser Aufnahme wird der Arzneistoff schnell abtransportiert.

Für den Transport des Arzneistoffes sind folgende Definitionen wichtig:

**Penetration:** Die Penetration ist das Eindringen von Wirkstoffen in eine Hautschicht.

**Permeation:** Die Permeation ist die Durchwanderung von Wirkstoffen durch eine oder mehrere Hautschichten, die sich im Aufbau unterscheiden.

**Resorption:** Die Resorption ist die Aufnahme von Wirkstoffen in das Blut.

Die Anzahl der Wirkstoffe, die perkutan appliziert werden können, ist durch die Barriereeigenschaft des Stratum corneum stark begrenzt. Wirkstoffe mit einem Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten von etwa 1, wie z.B. Nitroglycerin, sind offensichtlich am besten dafür geeignet [Landmann, 1991].

Das Eindringen von Arzneistoffen und Vehikelbestandteilen kann prinzipiell auf drei verschiedenen Wegen erfolgen, durch die Haarfollikel mit den dazugehörigen Talgdrüsen, durch die Schweißdrüsen oder direkt durch das Stratum corneum. Da die Haarfollikelöffnungen und die Schweißdrüsenausgänge nur etwa 0,1 % der Hautoberfläche einnehmen [Barry, 1993], wird ihre Bedeutung für den Arzneistofftransport in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Viele Autoren bescheinigen dem transfollikulären Weg nur eine sehr geringe Bedeutung, dem gegenüber weisen Lauer et al. (1995) darauf hin, dass die Bedeutung dieses Weges stark unterschätzt wird. Mit Hilfe eines follikelfreien Rattenmodells konnte für den Modellarzneistoff Hydrocortison von Illel und Schaefer (1988) gezeigt werden, dass der Arzneistofftransport im Fließgleichgewicht durch die behaarte Haut um den Faktor 50 höher ist als durch die follikelfreie Vergleichshaut. Außerdem zeigt das Stratum corneum der follikelfreien Haut für Testosteron und Hydrocortison eine ausgeprägtere Reservoirfunktion als das Stratum corneum der normalen Haut [Hueber et al., 1992]. Im Gegensatz dazu zeigten Hisoire und Bucks (1997), dass Retinsäure durch haarlose Haut des Meerschweinchens stärker penetriert als durch behaarte Haut. Eine Erklärung für die von Illel und Schäfer gefundenen Ergebnisse könnte in dem Verfahren zur Gewinnung von follikelfreier Haut liegen, bei dem die Haut einer thermischen Belastung ausgesetzt wird und es daher fraglich erscheint, ob die so gewonnene Haut die gleichen biochemischen und physikalischen Eigenschaften aufweist wie die ursprüngliche follikuläre Haut [Hisoire und Bucks, 1997].

Loth (1986) merkte dazu an, dass die Diffusion durch die Anhangsgebilde für Elektrolyte, andere sehr polare Moleküle und für große Moleküle (z.B. Nystatin, Neomycin, Tetracyclin) eine Rolle spielt. Allerdings permeieren selbst bei iontophoretisch applizierten Wirkstoffen nur etwa 20 % des Wirkstoffes durch diese sogenannten shunt routes, so dass bei der normalen Arzneistoffpermeation der auf diesem Wege permeierte Anteil wohl vernachlässigbar sein dürfte. Allein in der Anfangsphase der Permeation könnte diese Route eine gewisse Rolle spielen [Lippold, 1981].

Der Arzneistofftransport durch das Stratum corneum kann auf zwei verschiedenen Routen erfolgen (Abbildung 2.7): Einerseits über die interzelluläre Route durch die Lipidbilayer der Interzellularen, andererseits über die transzelluläre Route, die abwechselnd durch die Korneozyten und die Lipidmatrix führt. Welcher Permeationsweg gewählt wird, ist unter anderem abhängig von der Lipophilie und der Größe des Arzneistoffes sowie von seinem Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten in den beschriebenen Teilen des Stratum corneum [Guy und Hadgraft, 1988]. Für die meisten Arzneistoffe wird der interzelluläre Permeationsweg angenommen. Allerdings steht für hydrophile Arzneistoffe der abwechselnde Weg durch die hydrophilen Bereiche der Korneozyten und die Lipidschichten zur Verfügung [Ziegenmeyer, 1989; Flynn, 1989]. Bei unpolaren Substanzen nimmt die Bedeutung des interzellulären Weges wieder zu.

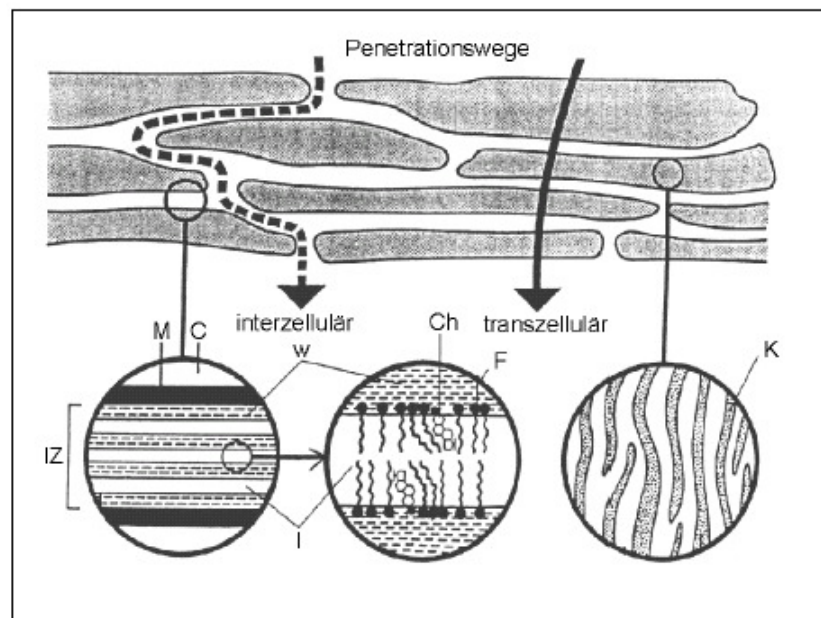


Abbildung 2.7: Darstellung der Permeationswege durch Stratum corneum [Bauer et al., 2002, nach Elias, 1981], IZ= Interzellularraum, M= Zellmembran, C= Zytoplasma, l= Lipophil, w= wässrig, Ch= Cholesterol/Cholesterolsulfat, F= Fettsäure/Triglyceride, K= Keratin,

Die Zusammensetzung des Stratum corneums ist von entscheidender Bedeutung für die Arzneistoffpermeation. Eine Extraktion der Lipide aus dem Stratum corneum führte bei Untersuchungen mit dem Modellarzneistoff Tiamenidin zu einer Vergrößerung des effektiven Diffusionskoeffizienten um den Faktor 1000 und zu einer deutlichen Verringerung der lag-time im Vergleich zu intaktem Stratum corneum [Lieckfeld und Lee, 1994]. Ebenso konnte von Hauck (1994) gezeigt werden, dass die Zusammensetzung und der Gehalt an Hornschichtlipiden einen Einfluss auf die Penetration von Flufenaminsäure in die Haut besitzt.

Wenn Arzneistoffe keine ausreichenden Permeationseigenschaften aufweisen, kann das Vordringen der Stoffe in tiefere Hautschichten durch eine Verringerung der Permeationsbarriere des Stratum corneums ermöglicht werden. Die Veränderung dieser Eigenschaften sollte reversibel sein und nicht zu Hautirritationen führen. Die dafür eingesetzten Permeationenhancer können Bestandteile des Vehikels sein oder der Zubereitung extra zugesetzt werden. Als Ziel von Permeationenhancern können die interzellulären Lipide oder das intrazelluläre Keratin dienen. Die Lipide bieten drei mögliche Angriffspunkte, an den polaren Kopfgruppen der Doppelschichten, in der wässrigen Schicht zwischen diesen und an den hydrophoben Lipidketten [Barry, 1991]. Wasser wird als sehr guter Permeationenhancer beschrieben, der in großer Menge die Ordnung der Lipide verringert [Bouwstra et al., 1991 b]. Eine Steigerung der Hydratation und eine dadurch erhöhte Permeabilität der Hornschicht kann auch durch Okklusion herbeigeführt werden [Barry, 1987]. Polare Substanzen können mit den polaren Kopfgruppen der Doppelschichten durch Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen in Interaktion treten und die Lipidschichten dadurch fluidisieren [Barry, 1987 und 1991]. Lösungsmittel wie Ethanol, Propylenglycol oder Dimethylsulfoxid sind in der Lage, die Lösungseigenschaften der Wasserschicht im interzellulären Bereich zwischen den polaren Kopfgruppen positiv zu beeinflussen [Barry, 1991; Neubert et al., 1996]. Die Fluidität der lipophilen Bereiche der Doppelschicht kann durch sehr lipophile Verbindungen wie Azone oder ungesättigte langkettige Fettsäuren erhöht werden. Diese Substanzen werden in die Lipidketten eingebaut und weiten deren Anordnung dadurch auf. Die Vergrößerung des lateralen Abstandes führt zu einer besseren Beweglichkeit der Lipidketten und schließlich zu einer größeren Durchlässigkeit [Goodman und Barry, 1986; Barry, 1987]. Amphiphile Moleküle können mit den hydrophilen Kopfgruppen und den Lipidketten in Wechselwirkung treten und so die Fluidität erhöhen [Barry, 1987].

## 2.4. Arzneistoffe zur dermalen Applikation

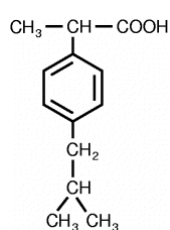
Mit Hilfe der dermalen Applikation können wirksame Substanzen direkt oder als Prodrugs an spezifische Zielstrukturen oder gewebliche Kompartimente der Haut gebracht werden.

Die Anwendung von Arzneistoffen auf der Haut erfolgt unter drei therapeutischen Zielsetzungen:

1. Der Arzneistoff soll auf der Hautoberfläche verbleiben, bzw. nur oberflächlich eindringen, z.B. Desinfektionsmittel.
2. Der Arzneistoff soll in der Haut oder tieferliegenden Geweben eine lokale Wirkung entfalten, z.B. Wärmesalben, entzündungshemmende Salben.
3. Der Arzneistoff soll in so hohen Dosen resorbiert werden, dass er eine systemische Wirkung ausüben kann. Dies wird nur für ausgewählte Arzneistoffe häufig mit speziellen Transdermalen Therapeutischen Systemen realisiert.

Aufgabe der Formulierung ist es, durch geeignete Wahl der Grund- und Hilfsstoffe sowie der Herstellungstechnologie eine ausreichende Freisetzung der Arzneistoffe aus der Arzneiform zu sichern, sowie eine entsprechenden Penetration und Permeation in bzw. durch die Haut.

### 2.4.1. Ibuprofen

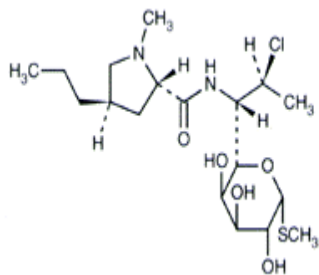


Das Arylpropionsäurederivat Ibuprofen ( $M_r$  206,27) zählt zu den chiralen nicht-steroidalen Antiphlogistika, deren Eutomer stets das (S) (+)-Enantiomer ist. Es ist jedoch zu beachten, dass es beim Menschen nach Verabreichung des Razemats durch das Enzym Epimerase, dessen physiologisches Substrat heute noch unbekannt ist, zu einer Epimerisierung im Sinne einer metabolischen unidirektionalen Bioinversion in das Eutomer kommt [Kaiser et al., 1976; Geißlinger, 1996]. Diese Epimerisierung ist der Grund dafür, dass trotz unterschiedlicher Wirkstärke der Enantiomere nach wie vor razemisches Ibuprofen für die Arzneiformung verwendet wird.

Zur peroralen Applikation von Ibuprofen stehen Präparate zur Verfügung, die vor allem die freie Säure oder aber das Lysinsalz enthalten. Der Vorteil von Ibuprofen-Lysinat ist seine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit, die ein schnelles Anfluten des Arzneistoffes im Blutkompartiment und damit einen schnellen Wirkungseintritt bewirkt [Geißlinger et al., 1989]. Die dermale Applikation von Ibuprofen erfolgt bis auf Einzelfälle in Form der freien Säure in Konzentrationen von 5-10 % in sogenannten Rheumasalben, -gels oder -sprays. Als

Indikation werden u.a. Arthritiden, Arthrosen sowie stumpfe Traumen angegeben [Mutschler, 1996].

#### 2.4.2. Clindamycin



Clindamycin ( $M_r$  424,98) gehört zu den Lincosamiden und ist ein 7-Chlorolincomycin, ein halbsynthetisches Derivat von Lincomycin aus *Streptococcus lincolnensis* var *lincolnensis* [Spoo und Riviere, 1995; Kapusnik-Uner et al., 1995]. Es handelt sich um eine schwache, fettlösliche Base [Brown, 1990]. Am 7. Kohlenstoffatom ist die Hydroxyl-

gruppe durch Chlorid ersetzt, wodurch ein besserer antibiotischer Effekt erfolgt [Spoo und Riviere, 1995; McEvoy, 1992]. Es gibt 2 verschiedene Salze, die zur Anwendung kommen, das Clindamycinhydrochlorid und das Clindamycindihydrogenphosphat. Beide haben eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit als das reine Clindamycin. Angewendet wird Clindamycin hauptsächlich oral bei Infektionen mit grampositiven Bakterien und Anaerobiern aber auch bei therapieresistenten Staphylokokkeninfektionen. Lokal findet es seine Anwendung bei Infektionen der Vaginalschleimhaut und als Aknetherapeutikum. Als letzteres wird es eingesetzt, weil es eine sinnvolle und effektive Alternative zur oralen Gabe von Minocyclin bei entzündlicher Akne Vulgaris darstellt [Sheehan-Dare et al., 1990] und als das effektivste topische Antibiotikum in der Aknetherapie gilt [Rumsfield und West, 1992].

#### 2.5. Zellkulturen

Die Gewebekultur, die sowohl die Organkultur wie auch die Zellkultur umfasst, wurde Anfang des 20. Jahrhunderts [Harrison, 1907; Carrel, 1912] entwickelt. Es war somit möglich, das Verhalten von Zellen unabhängig von systemischen Variationen zu studieren. Aufbauend auf den Erkenntnissen mit Primärexplantaten kam es nach 1950 zu einer explosionsartigen Ausdehnung der Zellkultur, die inzwischen wichtiger Bestandteil naturwissenschaftlicher Forschung sowie Praxis ist [Freshney, 1990]. Zellkulturen werden heute u.a. zur Produktion monoklonaler Antikörper mittels Hybridomatechnik [Köhler und Milstein, 1975], zur Erforschung der Zellgenetik oder zum Studium zellulärer Wechselwirkungen und intrazellulärer Kontrollmechanismen der Zelldifferenzierung und Entwicklung [Auerbach und Grobstein, 1958; Cox, 1974; Bell et al., 1981] genutzt.

Ein Problem stellte die begrenzte Lebensdauer von 20-100 Generationen bei nativen Zellen in Kultur dar, die mit einem zum Ende hin rasch eintretenden Alterungsprozess und einer stark verminderten Wachstumsrate einhergeht. Durch eine Transformation, die meist durch eine Transfektion der Zellen mittels einer Infektion mit SV 40 Viren bzw. Behandlung der Zellen mit dem entsprechenden SV 40 large-T Antigen [Freshney und Freshney, 1996] erfolgt, kann z.B. eine frühzeitige Alterung der Zellen verhindert werden. Die Zellen sind immortalisiert und so nahezu unbegrenzt kultivierbar. Außerdem zeichnen sich diese Zelllinien oft durch eine verstärkte Wachstumsrate verbunden mit einer höheren Sättigungsdichte in Kultur sowie einem geringeren Serumbedarf im Wachstumsmedium aus. Als ein Nachteil ist allerdings bei transformierten Zellen der im Vergleich zu normalen Zellen oft verringerte oder veränderte Differenzierungsstatus von Zellen mit spezifischen Eigenschaften zu sehen.

Ausgehend von Zellkulturen unterschiedlichster Herkunft und Differenzierung wurde in den vergangenen Jahren mit sehr unterschiedlicher Zielsetzung versucht organotypische Äquivalente zu rekonstruieren.

### **2.5.1. Kultivierung dermalen Zellen**

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden 1914 von Kreibich erste Schritte zur Kultivierung epidermalen Zellen unternommen. Eingesetzt wurden dazu Teile menschlicher oder tierischer Haut, sogenannte Organkulturen. Ein Vorteil dieser Kultivierung ist die Tatsache, dass die Zellen in ihrem ursprünglichen Verband bleiben. Allerdings überwiegen nach längerer Kultivierung nekrotische Prozesse, die durch die Unterversorgung mit Nährstoffen hervorgerufen werden, so dass sich die Eigenschaften der Haut deutlich verändern. Vollhaut eignet sich deshalb nur für eine kurzzeitige Kultivierung *in vitro*, um z.B. den Einfluss pharmakologisch wirksamer oder physiologischer Substanzen zu untersuchen.

Einen weiteren Schritt im Hinblick auf die Kultivierung unter definierten Bedingungen stellten Explantatkulturen dar. Dazu wurden Vollhautstücke submers kultiviert und die herauswachsenden Zellen untersucht. Auf diese Weise konnten Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten und insbesondere das Wachstum und die Differenzierung *in vitro* charakterisiert werden [Flaxman et al., 1967; Halprin et al. 1979].

Allerdings entsprechen Wachstum, strukturelle Organisation und die Differenzierung der Zellen in Organ- und Explantatkulturen nicht denen einer Epidermis *in vivo* [Holbrook und Hennings, 1983]. Durch die Anwesenheit von dermalem Gewebe kommt es zu einem starken

Auswachsen von Fibroblasten aus den Explantaten, wodurch das Wachstum der epidermalen Zellen sehr schnell beeinträchtigt wird.

Ein Fortschritt für die Kultivierung rein epidermaler Zellen ergab sich in den vierziger Jahren. Durch Proteaseeinwirkung war eine enzymatische Trennung der Epidermis von der übrigen Haut möglich. Die auf diese Weise erhaltene Epidermis war nach Transplantation oder in Kultur lebensfähig.

Zellen, die unmittelbar aus einem Gewebe oder Organ isoliert wurden, bezeichnet man als Primärkultur. Durch Veränderung der Isolationstechniken, Kulturmedien, Wachstumsfaktoren und anderer Kultivierungsbedingungen war es möglich, Zellen aus Primärkulturen in weitere Zellkulturgefäße zu überführen. Dieser Vorgang wird als Subkultivierung bezeichnet.

In Zellkultursystemen aus isolierten epidermalen Zellen können die Regulation von Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten untersucht werden. Allerdings führt eine Kultivierung unter normalen Bedingungen, submers auf Glas- oder Kunststoffoberflächen, nicht zur Ausbildung einer mehrschichtigen und differenzierten Epidermis.

Erste Versuche humane Keratinozyten zu kultivieren zeigten, dass ein mesenchymaler Einfluss für die Proliferation der Zellen sehr wichtig ist. Rheinwald und Green (1975) kokultivierten Keratinozyten aus diesem Grund mit durch Gamma-Strahlen inaktivierten dermalen Fibroblasten, während Yuspa et al. (1981) die Kultivierung in durch Fibroblasten konditioniertem Medium wählten. Durch die Gamma-Strahlen wird die Proliferation der Fibroblasten unterdrückt, ohne dass die Synthese der für das Wachstum der Keratinozyten wichtigen Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Durch eine Modifizierung der Kultivierungsbedingungen gelang es später humane Keratinozyten auch ohne mesenchymalen Einfluss zu kultivieren. Als Standardmedium für diese Kultivierung wurde Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), das u.a. mit Insulin, Hydrocortison und epidermalem Wachstumsfaktor supplementiert ist [Holbrook und Hennings, 1983], eingeführt.

Eine andere Weiterentwicklung lag in dem Einsatz unterschiedlicher Substrate zur Zellkultivierung. Durch Beschichtung der Glas- oder Kunststoffoberfläche der Zellkulturgefäße mit meist physiologischen Substanzen wie z.B. Kollagen oder Gelatine konnte die Anheftungseffektivität erhöht werden.

Die Subkultivierung von Keratinozyten menschlichen Ursprungs ist mit etwa 6-9 Passagen begrenzt [Hawley-Nelson et al., 1980], wobei die Proliferationskapazität um so höher ist, je jünger der Hautspender ist [Rheinwald und Green, 1975]. Aus diesem Grund werden zum Anlegen von Primärkulturen meist Keratinozyten verwendet, die aus der Vorhaut von

Säuglingen nach der Beschneidung isoliert wurden. Die Fähigkeit der Zellen in Kultur DNA-Schäden durch entsprechende Reparaturmechanismen zu beheben, ist jedoch unabhängig vom Spenderalter [Bowden et al., 1977].

### **2.5.2. Dermale Zellkulturen**

Mit Hilfe von Zellkulturen epidermaler und dermaler Zellen sind In-vitro-Modellsysteme zu generieren, die eine Untersuchung verschiedener Aspekte epidermaler Proliferation und Differenzierung ermöglichen. Je nach zu untersuchendem Aspekt wurden unterschiedlichste Hautmodelle (Vollhautmodel, Epidermismodel, Hautmodelle mit immunkompetenten Zelle, etc.) entwickelt, die allerdings ihr Hauptziel, die Kultivierung der Epidermis in vitro mit gleichen charakteristischen, strukturellen und funktionalen Aspekten einer Epidermis in vivo, noch nicht erreicht haben.

#### **2.5.2.1. Fibroblasten**

Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Synthese der Interzellulärsubstanz, der extrazellulären Matrix, spielen. Zu den Produkten von Fibroblasten gehört hauptsächlich das Kollagen, das zusammen mit den ebenfalls gebildeten Proteoglykanen für eine erhöhte Festigkeit der extrazellulären Matrix sorgt.

In Zellkulturmodellen der Haut handelt es sich entweder um Vollhautmodelle aufgebaut aus Dermis- und Epidermisäquivalent oder um reine Epidermismodelle. Grundlage der Vollhautmodelle ist meist ein kontrahiertes Fibroblastengel, das durch Zugabe von Fibroblasten zu einer Kollagenlösung entsteht [Bell et al., 1979]. Die Fibroblasten sind in der Lage das Kollagennetzwerk zu kontrahieren und ein elastisches Dermisäquivalent auszubilden.

In der Literatur ist bisher nur der Einsatz nativer Fibroblasten, die im Gegensatz zu den immortalisierten Zelllinien der Keratinozyten und Sebozyten zur Alterung neigen und deshalb nicht unbegrenzt kultivierbar sind, beschrieben, da die Zellen einfach zu isolieren sind und sich ohne schnelle Alterungsprozesse oder andere Veränderungen sehr gut kultivieren lassen.



### **2.5.2.2. Keratinozyten**

Ein großer Nachteil beim Einsatz von nativen humanen Keratinozyten in Kultur ist der schnell eintretende Alterungsprozess der Zellen, der sich in einer stark verminderten Wachstumsrate und auch in einer morphologischen Veränderung auswirkt. Aus diesem Grund ist es sinnvoll transformierte Zellen einzusetzen.

Die verwendete HaCaT-Zelllinie (human adult keratinocytes, low calcium conditions, elevated temperature) ist eine spontan und ohne äußeren Einfluss transformierte Zelllinie. Sie stammt von Zellen humanen Ursprungs ab und ist zur Expression des gesamten epithelialen Differenzierungsprogrammes fähig [Boukamp et al., 1988]. Durch eine relativ hohe Kultivierungstemperatur von 38,5 °C wurde die Transformation unterstützt. Die dadurch erhaltene Immortalisierung der Zelllinie zeigt sich in einer Passagierbarkeit von mehr als 140 Passagen. Der in den Zellen enthaltene Chromosomensatz ist abhängig vom Passagierungsgrad. Beginnend mit einem normalen diploiden Chromosomensatz ändert sich dieser über hypodiploid zu hypotetraploid. Besonders hervorzuheben ist, dass die Zelllinie trotz der Transformation keine malignen Veränderungen aufweist. Nach Transplantation auf thymuslose Nacktmäuse entwickelt sich eine vielschichtige, ausdifferenzierte Epidermis ohne das Auftreten von invasivem Wachstum [Boukamp et al., 1988]. Im Zellkulturmodell bildet sich auf einem fibroblastenhaltigen Kollagengel eine Epidermis, die morphologisch einer humanen nativen Epidermis sehr ähnlich ist [Specht, 1998]. Auf struktureller Ebene werden wichtige Differenzierungsmarker wie die Keratine K1 und K10, Involucrin und Filaggrin exprimiert.

Unterschiede sind im Fettstoffwechsel detektierbar. Die Cholesterolsynthese der transformierten Zellen wird im Gegensatz zu nativen Keratinozyten über LDL-Rezeptoren vermittelt [Schürer et al., 1993]. Der Gesamtlipidgehalt von HaCaT-Zellen und nativen humanen adulten Keratinozyten unterscheidet sich nicht.

### **2.5.2.3. Sebozyten**

Eine Isolierung von Sebozyten aus dem umgebenden Gewebe wurde von Kellum (1966) und Kealey et al. (1986) beschrieben. Bei den Sebozyten handelt es sich um Zellen der Talgdrüse (s. Abschnitt 2.1.7.2.), die sich im Laufe der Zeit differenzieren und unter Abgabe ihrer Lipide zu Grunde gehen. Sebozyten in Kultur gleichen denen im Originalgewebe und zwar zum größten Teil den undifferenzierten Zellen, die noch mitotisch aktiv sind und sich am

Rand der Talgdrüsenazini befinden [Jenkinson et al., 1985], aber es sind auch Zellen vorhanden, die sich im frühen Stadium der Differenzierung befinden [Plewig et al., 1971].

Xia et al. gelang es 1989 Sebozyten als Auswüchse aus isolierten Talgdrüsenlappen als Monolayer zu kultivieren. Untersuchungen zur Morphologie, Zellchemie und immunocytochemischer Muster deuten auf einen Differenzierungsprozess hin, der mit Sebozyten in vivo vergleichbar ist. Weitere Untersuchungen zur Vergleichbarkeit mit Sebozyten in vivo zeigen auch bei Sebozyten in Kultur eine gesteigerte Lipidsynthese mit einer progressiven Differenzierung der Zellen [Zouboulis et al., 1994]. Das Modell wurde seitdem vielfach genutzt, um die Aktivität der Talgdrüsen zu erläutern und die Regulation auf Zellebene zu verstehen [Zouboulis et al., 1998]. Insbesondere Untersuchungen zur Entwicklung und Behandlung von Seborrhoe und Akne sind möglich [Zouboulis, 1992; Zouboulis et al., 1998]. Der gleichen Forschergruppe gelang es Sebozyten der menschlichen Gesichtshaut mit Hilfe des SV40 large-T Antigen zu transformieren, so dass die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 mit den gleichen morphologischen, phenotypischen und funktionalen Charakteristika wie normale menschliche Sebozyten entstand [Zouboulis et al., 1999]. Die Zelllinie SZ 95 zeigt auch nach 25-40 Passagen noch eine Lipidsynthese von Squalen, Wachsesteren, freien Fettsäuren und Triglyceriden, und es werden ebenso die für Sebozyten typischen Keratine 7, 13 und 19 exprimiert [Zouboulis et al., 1999].

### **2.5.3. Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung**

Bei der Kultivierung insbesondere von epidermalen Zellen ist der Einfluss von Medienbestandteilen, kokultivierten Zellen und der Kultivierungsbedingungen auf Proliferation und Differenzierungsstatus der Zellen sehr wichtig. Darauf aufbauend wurde in den letzten Jahren zunehmend versucht für verschiedenste Gewebe organotypische Äquivalente zu kultivieren, um zum einen die Charakteristika dieser Gewebe auf zellulärer Ebene zu untersuchen und zu verstehen, und zum anderen diese Kulturen als In-vitro-Modelle, z.B. für Permeations- und Toxizitätsstudien, zu nutzen.

Die meisten Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt es zur Kultivierung von organotypischen Hautäquivalenten. Als Grundlage dafür dienten die Untersuchungen von Fusenig et al. (1982) und Prunieras et al. (1983) zur Kultivierung von epidermalen Zellen auf Kollagensubstraten und zur Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze. Es konnte gezeigt werden, dass die so erhaltenen Hautäquivalente histologische Ähnlichkeit mit dem Originalgewebe aufweisen [Régnier et al., 1992; Parenteau 1994; El-Ghalbzouri et al., 2002]. Aufgrund der Ausprägung

gewebespezifischer Marker (z.B. Keratine) und bestimmter Strukturen wie z.B. dem Stratum corneum werden sie als In-vitro-Modelle eingesetzt [Gay et al., 1992; Specht et al., 1998; Asbill et al., 2000].

Die Kultivierung und Verwendung von humanem intestinalen Epithelium ist ebenso weit verbreitet. Zumeist wird für Transportstudien von Substanzen durch Zellmonolayer die kontinuierliche, gut untersuchte Caco-2-Zelllinie verwendet [Hidalgo und Li, 1996; Nerurkar et al., 1996; Knipp et al., 1997], die aus Zellen eines humanen Kolon-Adenokarzinoms hervorgegangen ist.

Eine vollständige Rekonstruktion der Cornea mit allen drei Gewebeschichten (Endothel, Stroma und Epithel) wurde erstmalig von Minami et al. (1993) mit isolierten bovinen Zellen beschrieben. Auch hier erfolgte wie bei den Hautäquivalenten eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze, so dass die Ausbildung typischer cornealer Strukturen beobachtet werden konnte. Weitere Modelle mit tierischen Zellen wurden beschrieben [Zieske et al., 1994], insbesondere für toxikologische Untersuchungen als Alternative zum Draize-Test [Schneider et al., 1997, 1999]. 1999 gelang es dann Griffith et al. erstmals ein humanes Corneaäquivalent zu entwickeln, dass als Basis für die zukünftige Entwicklung bezüglich implantierbarer Gewebe beschrieben wurde. Für Permeationsstudien mit Arzneistoffen zur ophthalmologischen Anwendung wurden ausgehend von bovinen Zellen [Tegtmeyer et al., 2001], porcinen Zellen [Reichl und Müller-Goymann, 2001 und 2003] und humanen Zellen [Reichl, 2003] Cornea-Konstrukte aufgebaut, die histologisch dem Originalgewebe ähneln und aufgrund ihrer Permeationsbarriereeigenschaften als Alternative zu Untersuchungen mit exzidierten Hornhäuten einzuordnen sind.

Neben diesen organotypischen Kulturen sind weitere zahlreiche In-vitro-Modelle auf Zellkulturbasis beschrieben, wie z.B. von bronchiale und alveoläre Epithelium [Gruenert et al., 1995; Elbert, 1998], buccaler Mucosa [Jacobsen et al., 1995] sowie der Blut-Hirn-Schranke [Franke et al., 2000].

Eine umfassende Übersicht zu Zellkultur-Modellen von biologischen Barrieren als In-vitro-Testsysteme für die Arzneistoffabsorption und -freigabe gibt Lehr [2002].

#### **2.5.4. Zellkulturmodelle der menschlichen Haut und ihr Einsatz**

In-vitro-Modelle der menschlichen Haut zur Untersuchung der Hautpenetration sind wichtig für Forschung und Entwicklung, insbesondere im Bereich der Pharmazie und Kosmetik. In den vergangenen Jahren sind viele Modelle der menschlichen Haut entwickelt worden, von

denen einige auch kommerziell erhältlich sind. Diese Modelle sind hinreichend in Bezug auf ihre Vergleichbarkeit mit menschlicher Haut untersucht worden und sind für verschiedene Fragestellungen wie z.B. Zytotoxizitätstest, Permeationsuntersuchungen und Metabolisierungsstudien, geeignet. Alle Hautmodelle sind von reproduzierbarer Beschaffenheit und bestehen aus humanen Keratinozyten, die an der Luft-Medium-Grenze kultiviert werden. Es entsteht so ein epidermales Gewebe, das die Merkmale eines intakten Stratum corneum und der lebenden Epidermis bis hin zum Stratum basale aufweist [Ponec, 1992; Rosdy et al., 1993, Netzlaff et al., 2005]. Unterschiede bestehen im Hinblick auf das Dermisäquivalent. Einige Hautäquivalente sind reine Epidermismodelle, die auf Nylongeflechten, Polycarbonatfiltern oder einer Kollagen-Matrix kultiviert wurden. Von den kommerziellen Modellen sind als wichtigste Epidermismodelle die Modelle Skinethic, Epiderm und Episkin zu nennen, deren Eignung derzeit in der BMBF Validierungsstudie zur Prüfung auf die Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen von 9 unabhängigen Laboren und dem ZEBET untersucht wird [Schäfer-Korting et al., 2006]. Des weiteren sind als Vollhautmodell u.a. das AST-2000 und das EpiDerm-FT 200 kommerziell erhältlich. Sie bestehen aus einem Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten als Dermisäquivalent und nativen Keratinozyten als Epidermisäquivalent.

Der Einsatz der Hautäquivalente ist sehr vielfältig. Hauptsächlich werden sie eingesetzt um in vitro Regulationsmechanismen zu untersuchen, die auf Wachstum und Differenzierung der Zellen Einfluss nehmen. Ein Vorteil ist hierbei der isolierte Zellverband, der seinem Ursprungsgewebe ähnelt und der unter definierten Bedingungen kultiviert werden kann. Des weiteren werden Hautäquivalente eingesetzt, um in vitro Rückschlüsse auf das Verhalten in vivo ziehen zu können. Ein Beispiel dafür sind Metabolisierungsstudien, die Aufschluss darüber geben, in welchem Maße topisch applizierte Wirkstoffe beim Durchtritt durch die Haut verstoffwechselt werden. Ernesti et al. zeigte 1992, dass von topisch appliziertem Testosteron 50 % beim Durchtritt durch das Hautäquivalent metabolisiert wurden und dass das Metabolitenspektrum dem von exzidierte Vollhaut entsprach.

Ein weiterer Einsatzbereich von Hautäquivalenten ist der Einsatz in Toxizitätsstudien. Es ist möglich, das irritative Potential einer Zubereitung zu testen. Gay et al. (1992) wiesen für einige dermale Irritantien ähnliche Schwellendosen wie für humane Haut nach. Der Vorteil in den Hautäquivalenten im Gegensatz zu Monolayerkulturen liegt darin, dass die zu untersuchende Zubereitung direkt auf die Oberfläche der künstlichen Epidermis aufgetragen werden kann. Bei den Monolayerkulturen konnten nur wasserlösliche Substanzen untersucht werden.

Zunehmend an Bedeutung gewinnt auch der Einsatz von Hautzellkulturen im Bereich der Wundheilung. Sie bieten im Gegensatz zu Monolayerkulturen, die schon länger verwendet werden, den Vorteil, dass durch die bereits ausdifferenzierte Epidermis mit funktionsfähigem Stratum corneum ein besserer Wundverschluss erreicht wird. Zudem verhindert das mittransplantierte Dermisäquivalent eine Wundkontraktion [Yannas und Burke, 1980].

Für den pharmazeutischen Bereich ist die Verwendung von Hautzellkulturen für Permeationsuntersuchungen von besonderem Interesse. Permeationsuntersuchungen werden durchgeführt, um die Arzneistoffmenge zu bestimmen, die über einen bestimmten Zeitraum betrachtet durch die Haut permeiert. Es können die Permeationseigenschaften von Wirkstoffen, aber auch der Einfluss der Zubereitungen untersucht werden. Permeationen durch organotypische Hautäquivalente zeigen im Allgemeinen eine höhere Permeabilität verglichen mit exzidiierter Vollhaut oder exzidiertem Stratum corneum [Ponec et al., 1990; Specht, 1998; Schäfer-Korting et al., 2006]. Trotz der Zunahme der Permeabilität konnte für einige Arzneistoffe die gleiche Reihenfolge im Vergleich mit exzidiierter Haut [Bell et al., 1981] und exzidiertem Stratum corneum [Specht, 1998; Wassermann und Müller-Goymann, 2000a] gefunden werden. Die Zunahme der Permeabilität ist abhängig vom untersuchten Arzneistoff, aber auch von der Zubereitung. Ernesti et al. zeigten 1992 für Estradiol, Hydrocortison und Testosteron eine um die Faktoren 63, 187 und 35 erhöhte Permeabilität der Hautäquivalente, während Ponec et al. (1990) für Saccharose und Nitroglycerin nur um die Faktoren 3 bzw. 10 höhere Werte nachweisen konnten. Einen deutlichen Einfluss der Grundlage zeigte Winkler (2005) in seinen Untersuchungen mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) und dem entsprechenden ALA-*n*-butylester. Bei der Verwendung von lipophilen Grundlagen beträgt der Unterschied für die freie Säure Faktor 64 und für den Ester Faktor 142, während für hydrophile Grundlagen die Permeation um den Faktor 860 bis ca. 2800 gesteigert ist.

## **2.6. Untersuchung der Arzneistoffaufnahme durch die Haut**

Wird ein Arzneistoff in einer halbfesten Grundlage appliziert, muss er innerhalb des Vehikels zuerst an die Grenzfläche zur Haut diffundieren und freigesetzt werden, um dann in das Stratum corneum penetrieren zu können. Die Freisetzung eines Arzneistoffs aus einem dermalen System hängt sehr stark von der Wechselwirkung zwischen Grundlage und Arzneistoff ab. Für eine Vorhersage über das Freisetzungsverhalten einer Arzneiform sind Freisetzungsuntersuchungen geeignet. Für die Aufnahme der Substanzen ist allerdings die Permeation durch das Stratum corneum entscheidend.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vehikel mit dem Stratum corneum in Wechselwirkung treten kann und so die Hautpermeation beeinflusst [Barry, 1987 und 1991; Neubert et al., 1996; Stoye et al., 1998]. Als Folge dessen können so für bestimmte Vehikel und Arzneistoffe ähnliche oder bessere Permeationseigenschaften gefunden werden als die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen gezeigt haben [Müller-Goymann und Alberg, 1999; Refai, 2001; Refai und Müller-Goymann, 2001].

Für Permeationsuntersuchungen dienen zumeist humane Vollhaut, dermatomisierte Haut, hitzeseparierte Epidermis, exzidiertes Stratum corneum aber auch organotypische Hautäquivalente. Franz (1975) zeigte für einige Substanzen bei Vollhaut eine gute Korrelation zur Permeation in vivo. Da die Hautpermeabilität von Geschlecht, Alter, Ernährungszustand und der Körperstelle aus der sie entnommen wurde sehr stark abhängig ist, sind vergleichbare Studien daher nur mit Hautspenden aus einer Körperregion von einer Person möglich, wodurch der Versuchsumfang begrenzt ist. Der Bezug zu anderen Hautspenden kann nur über Referenzformulierungen erfolgen. Da wie in Abschnitt 2.1.3. beschrieben das Stratum corneum die Hauptpermeationsbarriere darstellt, kann auch dieses allein für Permeationsuntersuchungen herangezogen werden. Sowohl in vivo als auch in vitro stellt das Stratum corneum mehrere Lagen toter verhornter Zellen dar und ist deshalb nach Isolierung der Hautproben länger haltbar als Vollhaut. Allerdings kann die bei lipophilen Substanzen häufige Anreicherung in den lebenden Epidermisschichten [Barry, 1983] mit isoliertem Stratum corneum nicht gefunden werden. Ein weiterer Nachteil von isoliertem Stratum corneum ist die durch den Versuchsaufbau bedingte starke und unphysiologische Hydratisierung des Stratum corneums. Da Wasser als Permeationenhancer wirkt, ist die In-vitro-Permeationsrate einer Substanz beeinflusst, wodurch die Vergleichbarkeit mit In-vivo-Daten nur eingeschränkt möglich ist.

Ein wichtiger Vorteil von organotypischen Hautmodellen für Permeationsstudien ist daher eine reproduzierbare Permeationsbarriere, die in unbegrenztem Umfang zur Verfügung steht. Diesen Vorteil bieten auch Schlachtabfälle wie das Rindereuter [Kietzmann et al., 1993], das genauso wie Tierhäute zur Untersuchung der Arzneistoffaufnahme durch die Haut eingesetzt werden kann. Schweinehaut bietet eine gute Alternative zur Humanhaut, da sie vergleichbare Eigenschaften aufweist [Simon und Maibach, 2000; Schmook et al., 2001], steht aber ebenfalls nicht unbegrenzt zur Verfügung.

Zur Quantifizierung von In-vitro-Permeationsuntersuchungen kann der Arzneistoffflux  $J$  berechnet werden, der sich aus der permeierten Arzneistoffmenge pro Zeit- und Fächeneinheit

ergibt [Flynn et al., 1974]. Unter der Voraussetzung von perfect sink-Bedingungen sowie der annähernden Konstanz der Ausgangskonzentration  $c_0$  des Arzneistoffes im Donorkompartiment über die Dauer des Versuches lässt sich der Arzneistoffflux nach Gleichung 2.1. beschreiben. Perfect sink-Bedingungen können durch Vermeidung des Anstieges der Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment auf Werte von über 10 % der Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffes während der Dauer des Permeationsexperimentes erreicht werden.

$$J = P \cdot c_0$$

$$J = \text{Arzneistoffflux [g/cm}^2 \text{ s]}$$

$$c_0 = \text{Arzneistoffausgangskonzentration im Donator [g/cm}^3 \text{]}$$

$$P = \text{Permeationskoeffizient [cm/s]}$$

*Gleichung 2.1.*

Der in Gleichung 2.1. enthaltene Permeationskoeffizient  $P$  setzt sich aus dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten  $D_s$  [cm<sup>2</sup>/s] des Arzneistoffes im Gewebe, dem Verteilungskoeffizienten  $K$  Zubereitung/Haut und der effektiven Hautdicke  $h$  [cm] nach folgender Gleichung 2.2 zusammen:

$$P = (D_s \cdot K) / h$$

*Gleichung 2.2.*

Werden die Ergebnisse einer Permeationsuntersuchung graphisch dargestellt, indem man die permeierte Menge an Arzneistoff gegen die Versuchsdauer aufträgt, so lässt sich im steady-state Bereich, welcher sich im linearen Abschnitt des Graphen befindet, der Arzneistoffflux  $J$  und unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentration  $c_0$  im Donator der Permeationskoeffizient  $P$  errechnen (Gleichung 2.3), der als Maß zur Beurteilung der Permeationsbarriereigenschaften von exzidierten Häuten und Zellkulturmodellen herangezogen wird.

$$P = J / c_0$$

*Gleichung 2.3.*

Liegt der Diffusionskoeffizient höher als der entsprechende Permeationskoeffizient, ist die Permeation durch die Haut der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im umgekehrten Fall kontrolliert die Zubereitung die Wirkstoffpermeation.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Verwendete Fertigarzneimittel**

###### **3.1.1.1. Ibutop Creme**

Ibutop Creme (Deutsche Cefaro Pharma GmbH, D-Waltrop) enthält Ibuprofensäure in einer Konzentration von 5 %. Es handelt sich um eine patentierte Creme mit einer O/W-Grundlage, die bei rheumatischen Beschwerden schmerzlindernd und entzündungshemmend wirkt. Die Zubereitung wurde für alle vergleichenden Permeationsuntersuchungen eingesetzt und diente als Positivkontrolle zur Evaluierung der Gewebeäquivalente.

###### **3.1.1.2. Basocin Akne Gel/ Lösung**

Basocin Akne Gel und Lösung (Galderma, D-Freiburg i. Br.) enthalten den Arzneistoff Clindamycindihydrogenphosphat in einer Konzentration von 1 %. Die Grundlage des Gels ist ein Polyacrylatgel, das mit PHB-Estern konserviert wurde, sowie Macrogol 400 und Propylenglycol als Feuchthaltemittel enthält. Es dient der Aknebehandlung von leicht austrocknender Haut. Die Lösung dagegen besteht hauptsächlich aus 2-Propanol und wird vorwiegend bei fettiger Haut verordnet.

##### **3.1.2. Kommerzielle Hautmodelle**

###### **3.1.2.1. AST-2000**

Hierbei handelt es sich um ein dreidimensionales Vollhautmodell der Firma Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (D-St. Katharinen). Es besteht aus dermalen Fibroblasten, die in eine Biomatrix eingebettet sind, und einer mehrschichtigen Epidermis mit Stratum corneum [Graefe und Fuchs, 1999]. Eingesetzt werden humane dermale Fibroblasten und proliferierende, differenzierende und verhornende humane Keratinozyten. Die Herstellung erfolgte durch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze für 14 Tage in chemisch definiertem Medium in Inserts (0,63 cm<sup>2</sup>) mit Polycarbonatmembran (Porengröße 0,8 µm).



AST-2000 ist nur für Forschungszwecke bestimmt und darf nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

### **3.1.2.2. Skinethic**

Verwendet wurde „Reconstituted Human Epidermis, large, age day 17” RHE/L/17 (im weiteren als Skinethic bezeichnet ) der Firma Skinethic (F-Nizza). Im Gegensatz zum Modell AST-2000 handelt es sich hierbei um ein reines Epidermismodell, das aus Keratinozyten aufgebaut ist und über eine 17-tägige Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze in chemisch definiertem Medium auf einem Polycarbonatfilter hergestellt wird [Rosdy und Clauss, 1990]. Poncet et al. (1997) konnten zeigen, dass alle wichtigen Strukturen der Epidermis, wie Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum vorhanden sind.

### **3.1.2.3. Epiderm**

Dieses Epidermismodell der Firma MatTek Corporation (USA-Ashland) ist aus nativen humanen Keratinozyten aufgebaut, die eine mehrschichtige differenzierte Epidermis analog zur menschlichen Epidermis ausbilden. Verwendet wurde das Model EPI-606-X (im weiteren als Epiderm bezeichnet). Es handelt sich um ein größeres Hautmodell im Gegensatz zum Standardmodell EPI-200, das von Cannon et al. (1994) erstmals als Epidermismodell für Hautfunktionsprüfungen beschrieben wurde, mit einer ausgeprägten Barrierefunktion speziell für Permeationsuntersuchungen.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Zellkulturen**

#### **3.2.1.1. Humane Zellkulturen**

##### **3.2.1.1.1. Humane dermale Fibroblasten (HDF)**

Humane Fibroblasten wurden aus der Vorhaut von Neugeborenen nach Beschneidung isoliert. Dazu wurde die zerkleinerte Vorhaut nach Behandlung mit einer Antibiotikallösung und Entfernung von subkutanem Gewebe mehrmals mit einer Lösung inkubiert, die

500 µg/ml Trypsin und 200 µg/ml EDTA enthielt. Diese Behandlung wurde so lange wiederholt, bis nur noch einzelne Zellverbände erkennbar waren. Die einzelnen Zellfraktionen wurden gepoolt und die Zellen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> in DMEM mit 10 % Serumzusatz kultiviert.

Die isolierten humanen Fibroblasten wurden von Dr. Katrin Kriwet (Organogenesis, USA-Camden, MA) zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.1.1.2. Keratinozytenzelllinie HaCaT**

Die HaCaT Zelllinie (human aadult keratinocytes, low calcium condition, elevated temperature) ist eine spontan transformierte Zelllinie von Keratinozyten humanen Ursprungs. Die HaCaT-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsrate aus. Das Differenzierungsprogramm entspricht mit einigen Abweichungen dem nativer humaner Keratinozyten. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. N.E. Fusenig (DKFZ, D- Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.1.1.3. Sebozytenzelllinie SZ 95**

Bei der Sebozytenzelllinie SZ 95 handelt es sich um menschliche Sebozyten, die der Gesichtshaut entnommen wurden. Sebozyten der 2. Subkultivierung einer 87-jährigen Spenderin wurden durch Behandlung mit einem rekombinanten SV (Simian Virus) 40 T Antigen retroviralen Vektor immortalisiert [Zouboulis et al., 1999]. Die Zelllinie wurde ab Passage 25 zur Verfügung gestellt und zur Etablierung eines eigenen Vorrates nach beschriebener Methode kultiviert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C.C. Zoubulis (Medizinische Fakultät Charité, D- Berlin) zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.1.2. Kultivierung und Subkultivierung**

Die Fibroblasten und Keratinozyten wurden unter Standardbedingungen [Freshney, 1990] in Ready Mix (DMEM High Glucose, PAA, A-Linz) kultiviert. Bei diesem Medium handelt es sich um Dulbecco's Modification of Eagles Medium DMEM, das bereits 10 % fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin sowie als Antibiotika 100 IU/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycinsulfat und 0,25 µg/ml Amphotericin B enthält.

Die Sebozyten wurden in Sebomed basal (Biochrom, D-Berlin) supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, 5 µg/l epidermalem Wachstumsfaktor EGF, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Ein Mediumwechsel wurde bei allen Zelllinien dreimal pro Woche durchgeführt. Zur Subkultivierung der Zellen wurden die Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit PBS gewaschen und für 5-8 min mit Trypsin 0,5 g/l-EDTA 0,2 g/l-Lösung bei 37 °C inkubiert. Der Prozess wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt, mögliche Zellcluster wurden durch heftiges Pipettieren gut vereinzelt, und die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:6 in neue 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Costar, D-Fernwald) überführt.

### **3.2.1.3. Kryokonservierung der Zelllinien**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach der Trypsinisierung zentrifugiert und in einer Konzentration von  $1-1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Gefriermedium, das aus dem Wachstumsmedium und 10 % DMSO (Sigma, D-Deisenhofen) als Kryoprotektivum bestand, suspendiert und eingefroren. Die Zellsuspension wurde 2 h in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gehalten, danach in die flüssige Phase (-196 °C) abgesenkt und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in warmem Wasser zügig erwärmt und langsam in 25 ml Medium suspendiert. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt, um Reste des toxischen DMSO zu entfernen.

### **3.2.1.4. Mikroskopie**

In der Routinekontrolle der Zellen wurde zur lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie ein inverses Phasenkontrastmikroskop ID03 (Zeiss, D-Oberkochen) genutzt. Zur weiteren Betrachtung und graphischen Dokumentation wurden ein Umkehrmikroskop Olympus IX50 (Olympus, D-Hamburg) mit Phasenkontrasteinrichtung und digitaler Bildaufnahme sowie die Bildbearbeitung Analysis (Soft Imaging System, D-Münster) eingesetzt.

### **3.2.1.5. Wachstumsverhalten**

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zellen zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Anhand dieser sigmoiden Kurve lassen sich typische Parameter wie Latenz-Phase (lag-Phase), Populationsverdoppelungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase und die Sättigungsdichte der Zellen in der Plateau-Phase ermitteln.

Zur Bestimmung des Wachstumsverhalten wurden 5.000-10.000 Zellen/Well in 24er Zellkulturplatten ausgesät. Zur Auszählung wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.2. beschrieben, abgelöst und durch kräftiges Pipettieren gut vereinzelt. Die Zellzahl konnte mit dem Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, D-Krefeld) bestimmt werden.

### **3.2.2. Aufbau der humanen Hautmodelle**

#### **3.2.2.1. Präparation des Rattenschwanzkollagens**

Das für die Herstellung der organotypischen Hautmodelle benötigte Kollagen wurde durch saure Extraktion aus Rattenschwanzsehnen gewonnen. Aus den Rattenschwänzen konnten nach einminütigem Einlegen in Ethanol 70 % die Sehnen durch Knicken der Schwanzspitze leicht herausgezogen werden [Freshney, 1990]. Die Sehnen von 10 Rattenschwänzen wurden nach Zerkleinerung mit einem Skalpell in 1000 ml Essigsäure 3 % unter Rühren gelöst. Ungelöste Bestandteile konnten über eine Filtration durch Mull entfernt werden. Die Lösung wurde sofort für 24 Stunden gegen 4000 ml Essigsäure 0,5 % unter Verwendung der Dialysemembran Spectropore MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles) dialysiert und anschließend in Aliquoten lyophilisiert. Zum Gebrauch wurde das Lyophilisat in Essigsäure 0,05 % zu der gewünschten Konzentration gelöst.

Die Zusammensetzung des so extrahierten Kollagens wurde in Untersuchungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Diese ergaben, dass überwiegend Kollagen Typ I extrahiert wurde [Boozchaloo und Reichl, 1996; Ghiani und Grobe, 2005].

#### **3.2.2.2. Herstellung der humanen Hautmodelle**

Der Aufbau der Hautmodelle erfolgte schrittweise (Abbildung 3.1) in Transwell Einsätzen (Costar, D-Fernwald) für Sixwell-Kulturplatten, die eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 3,0 µm und einem Durchmesser von 24 mm besitzen. Dieser spezielle

Einsatz ermöglicht sowohl eine submerse Kultivierung von Zellen als auch ein Wachstum der Zellen an der Luft-Medium-Grenze.

Das in Abschnitt 3.2.2.1. erhaltene Kollagen wurde in einer Konzentration von 4,8 mg/ml in 0,05 % Essigsäure gelöst. Zur Herstellung von 6 Dermisäquivalenten wurden 8 ml dieser Kollagenlösung mit 11 ml Essigsäure 0,05 % erneut verdünnt, so dass sich eine Ausgangskonzentration von 2,0 mg Kollagen/ml Essigsäure ergab. Diese Kollagenlösung wurde mit 5,6 ml einer Gelvormischung bestehend aus 2,2 ml 10 x MEM (minimal essential medium, ICN, D-Eschwege), 0,2 ml L-Glutamin (Gibco, D-München), 0,7 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (71,2 mg/ml, Sigma, D-Deisenhofen) und 2,5 ml fetalem Kälberserum (Gibco, D-München) versetzt. Anschließend wurden schnell 2 ml Zellsuspension (125.000 Fibroblasten/ml) in der pH-neutralen Mischung verteilt, die Mischung gut gemischt und zügig auf die Polycarbonatmembran der Transwell Einsätze aufgebracht, bevor sich das Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten bildete [Bell et al., 1981]. Nach 2 h wurde das Dermisäquivalent mit einem Spatel vorsichtig von der Wandung und dem Boden des Transwells gelöst und mit insgesamt 5 ml DMEM Wachstumsmedium submers für 7 Tage in Ready Mix (s. Abschnitt 3.2.1.2) kultiviert. In dieser Zeit kommt es durch das Vorhandensein und die Lebensfähigkeit der Fibroblasten zur Kontraktion des Kollagengels. Es erfolgte in dieser Zeit kein Mediumwechsel.

Zur Rekonstruktion des epidermalen Gewebes wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen einer Suspension von trypsinisierten HaCaT-Zellen abzentrifugiert, in 50-70 µl DMEM Wachstumsmedium aufgenommen und vorsichtig auf ein kontrahiertes Kollagengel pipettiert. Zur Anheftung der Zellen wurde das Konstrukt für 2 h im Inkubator bei 37 °C belassen. Danach wurden 5 ml DMEM Wachstumsmedium hinzugefügt und erneut 7 Tage in Ready Mix kultiviert, wobei dreimal pro Woche ein Mediumwechsel erfolgte.

Zur Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis war es nötig, das Konstrukt in Anlehnung an In-vivo-Bedingungen nur von unten mit Nährstoffen zu versorgen. Dazu wurde es für weitere 14 Tage an der Grenzfläche zwischen Medium und Luftumgebung kultiviert. Zu diesem Zweck wurden die Transwell Einsätze mit Hilfe von Metallplatten angehoben, so dass das Konstrukt mit ca. 3 ml Medium unterschichtet werden konnte und nur durch Diffusion der Nährstoffe von unten kultiviert wurde. Das Epidermisgewebe hatte Kontakt zur Luftumgebung.

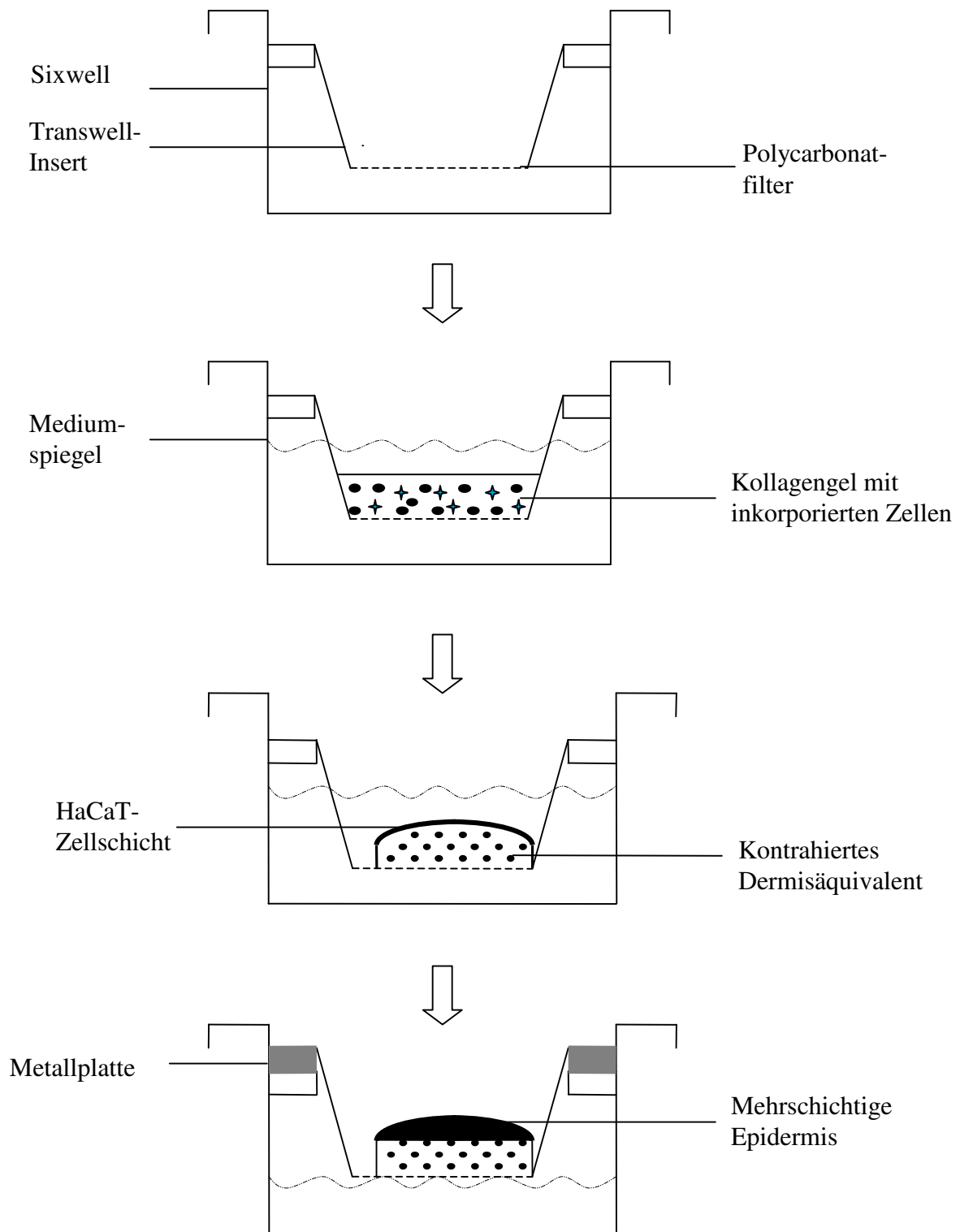


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des schrittweisen Aufbaus des Hautmodells

Während der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze diente als Medium eine Mischung aus 3 Anteilen DMEM und 1 Anteil Ham's F-12 (beide Gibco, D-München), die mit Adenin (24,3 µg/ml), Insulin (5 µg/ml), Dexamethason (0,4 µg/ml), Trijodthyronin (20 ppm, alle von Sigma, D-Deisenhofen), Transferrin (5 µg/ml, ICN; D-Eschwege), Ethanolamin (6,1 µg/ml), Phosphorylethanolamin (14,1 µg/ml, beide Biochrom, D-Berlin), seleniger Säure (6,8 ng/ml, Aldrich, D-Steinheim), Antibiotikazusatz (100 IU/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycinsulfat, 0,25 µg/ml Amphotericin B) und fetalem Kälberserum (2 %, Gibco, D-München) angereichert war. Der Mediumwechsel erfolgte auch hier dreimal pro Woche.

Es ergab sich eine Gesamtkultivierungszeit für die Hautmodelle von 4 Wochen.

Es wurden außerdem Hautmodelle mit inkorporierten Sebozyten hergestellt. Die Sebozyten wurden wie unter 3.2.1.2. beschrieben kultiviert. Zur Cokultivierung der Sebozyten mit den Fibroblasten im Dermisäquivalent wurden sie gemeinsam mit den Fibroblasten zur Gelvormischung gegeben. Die entsprechende Zellsuspension enthielt 125.000 Fibroblasten/ml und 50.000 Sebozyten/ml.

Um die Sebozyten in das Epidermisäquivalent zu inkorporieren wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 20 µl Wachstumsmedium DMEM aufgenommen und gemeinsam mit den HaCaT-Zellen auf das Konstrukt pipettiert.

Im Vergleich zu unserem selbstisolierten Kollagen aus Rattenschwanzsehnen (s. Abschnitt 3.2.2.1.) wurde außerdem ein kommerziell erhältliches Kollagen (IBFB, D-Berlin) in einer halb so hohen Konzentration (1 mg/ml) eingesetzt.

### **3.2.2.3. Kryokonservierung der Hautmodelle**

Zur Kryokonservierung der Hautmodelle wurden diese in den Transwell-Einsätzen in sterile Aluminiumfolie eingepackt und zuerst für 2 h in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gehalten, bevor sie in die flüssige Phase abgesenkt und dort bis zu 6 Monate gelagert wurden. Zum Auftauen wurden die in Aluminiumfolie verpackten Hautmodelle zuerst für 10 min im Inkubator bei 37 °C aufgetaut und anschließend in den Sixwell-Kulturplatten mit Medium unterschichtet und für weitere 10 min im Inkubator bei 37 °C aufgetaut.

### **3.2.3. Charakterisierung der Hautmodelle**

Um strukturelle Besonderheiten und spezielle Eigenschaften von Geweben zu untersuchen, bedient man sich ganz gezielt verschiedenster histologischer Untersuchungsmethoden. Im Folgenden werden die genutzten Methoden vorgestellt, die dazu dienen, das humane Hautmodell und exzidierte Haut bezüglich typischer histologischer Merkmale zu vergleichen. Außerdem werden weitere Untersuchungsmethoden vorgestellt, die dazu dienen die Hautmodelle näher zu charakterisieren.

#### **3.2.3.1. Histologische Schnittpräparate**

Das Gewebe, sowohl exzidierte Haut als auch das Hautmodell, wurde in einer 75 mM Phosphatpuffer-Lösung pH 7, die 3,5 % Formaldehyd (Merck) enthielt, über Nacht bei 4 °C fixiert. Die nachfolgenden Arbeiten einschließlich der histochemischen Färbungen wurden freundlicherweise im Pathologischen Labor Dr. E. Parussis (D-Braunschweig) durchgeführt. Die Gewebestücke wurden mit Isopropylalkohol dehydratisiert, anschließend in Einbettkassetten in geschmolzenem Hartparaffin eingeschlossen und für den Schnitt entsprechend ausgerichtet. Nach Auffüllen mit flüssigem Paraffin ergab sich ein Block, aus dem mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dünne Querschnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden für weitere Untersuchungen auf entsprechende Objektträger aufgebracht.

##### **3.2.3.1.1. Histochemische Färbung**

Zur Betrachtung des Gewebes im Lichtmikroskop wurde mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (H&E Färbung) gefärbt, wobei Hämatoxylin die Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma rot einfärbt. Die Gewebeschnitte konnten mit dem Umkehrmikroskop Olympus IX 50 (s. Abschnitt 3.2.1.4.) ausgewertet werden.

#### **3.2.3.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen**

Zum Vergleich der Strukturmerkmale der Oberflächen der humanen Haut und der humanen Hautmodelle wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden sowohl die exzidierte Haut als auch die Hautmodelle mit 1,5 % Paraformaldehyd (Aldrich, D-Steinheim), 3 % Glutaraldehyd (Fluka Chemie, CH-Buchs) und 1,5 % Acrolein



(Acros Organics, B-Geel) in 0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,2 (Sigma, D-Steinheim) bei 20 °C für 24 h fixiert und danach mit Wasser gespült. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit einer wässrigen Lösung pH 6,2, die 2 % Glycin (Roth, D-Karlsruhe), 2 % Natriumglutamat (Fluka) und 2 % Saccharose (Merk, D-Darmstadt) enthielt, bei 20 °C für 12 h behandelt und mit Wasser gespült. Für weitere 12 h wurde bei 20 °C mit einer wässrigen Lösung pH 4 von 2 % Tanninsäure (Merck) imprägniert und wiederum mit Wasser gespült. Sodann wurden die Gewebestücke mit einer wässrigen Lösung die 2 % Osmium-(VIII)-oxid (Riedel-de Häen, D-Seelze) enthielt, bei 20 °C für 12 h nachfixiert. Danach wurde über eine aufsteigende Isopropanolreihe (70-100 %) entwässert, und das Gewebe nach Ausrichtung in einer SCD 040-Sputteranlage (Balzers, D-Wiesbaden) unter Argonatmosphäre mit Gold bedampft.

Das Stratum corneum konnte nach Isolierung (s. Abschnitt 3.2.4) und Trocknung im Exsiccator direkt mit Gold bedampft werden.

Die Proben konnten am Institut für Schweißtechnik der TU Braunschweig mit einem JSM-6480 Rasterelektronenmikroskop (Joel, J-Tokio) untersucht werden.

### **3.2.3.3. Quantifizierung der Hautlipide**

Mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Lipidfraktionen der Hautmodelle aufgetrennt und anschließend über densitometrische Auswertung nach erfolgter Derivatisierung bestimmt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte nach der Methode eines externen Standards.

Es wurden Ceramide III und IV, freie Fettsäuren (als Ölsäure), Sterole (als Cholesterol), Sterolester (als Cholesterolester) und Triglyceride (als Triolein) aufbauend aus den Erfahrungen von Hauck (1994) und Theobald (1998) und unter Berücksichtigung der Methoden von Wertz [Wertz und Downing, 1989] bestimmt.

Zur Probenaufbereitung wurden die Hautmodelle gefriergetrocknet, das Trockengewicht bestimmt und in dicht schließenden Gefäßen mit 5,0 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1, v/v) versetzt, mehrmals täglich auf dem Vortex-Mischer geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Lösung in ein vorgewogenes Gefäß durch eine Pasteurpipette mit entfetteter Watte filtriert, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft und anschließend das Extraktgewicht erfasst. Der Rückstand wurde mit Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) aufgenommen (100 µl je ca. 5 mg Extrakt).

Ceramide III und IV (Fließmittel: Chloroform/ Methanol/ Eisessig (100 %) 190:9:1, v:v:v), Cholesterol und Ölsäure (Fließmittel: n-Hexan/ Diethylether/ Eisesseig (100 %) 80:20:10,

v:v:v) und Triolein und Cholesterolester (Fließmittel: n-Hexan/ Diethylether 80:20, v:v, 10 cm und Petrolether 15 cm) wurden paarweise gemeinsam auf einer HPTLC Platte aufgetragen und bestimmt.

Auf einer HPTLC Platte wurden Verdünnungen der Kalibrierreihen der jeweiligen Substanzen und 1 µl der Proben aufgetragen. Nach der Entwicklung wurden die Platten mindestens 15 min an der Luft getrocknet, anschließend mit Kupfersulfat/Phosphorsäure-Reagenz besprüht (bis zur beginnenden gleichmäßigen Transparenz) und auf der Heizplatte derivatisiert. Dazu wurde die Heizplatte nach Auflegen der HPTLC-Platte von 110 °C auf 160 °C hochgeheizt. Nach Abkühlung der Platten unter Lichtschutz (maximal 15-20 min) wurden die Platten mit einem handelsüblichen Scanner gescannt und die entstehende Bilddatei anschließend im Programm TNIMAGE nach der Methode des externen Standards ausgewertet.

Alle Arbeitsschritte nach der Gefriertrocknung der Hautmodelle wurden freundlicherweise von Dr. Ulrich Schäfer und Herrn Peter Meiers an der Universität des Saarlandes durchgeführt. Damit genügend Lipide extrahiert werden konnten, wurden 4 Hautmodelle gemeinsam gefriergetrocknet. Zum Vergleich wurden ebenfalls die reine Kollagenmatrix, das Rohkollagen und die einzelnen Zelllinien gefriergetrocknet und untersucht. Um zu erkennen in welchem Bereich der Hautmodelle die Lipide zu finden sind, wurde das Epidermisäquivalent vom Dermisäquivalent vorsichtig entfernt, und beide Äquivalente wurden voneinander getrennt untersucht.

#### **3.2.3.4. Immunhistologischer Laminin-Nachweis**

Um das Herauslösen von Substanzen oder die Denaturierung von Proteinen zu verhindern, wurde die immunhistologische Untersuchung an Gefrierschnitten durchgeführt. Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte wiederum im Pathologischen Labor Dr. E. Parussis (D-Braunschweig).

Die Gewebestücke der humanen Hautmodelle wurden mit Cryo-Embedding-Compound (Microm Laborgeräte GmbH, D-Walldorf) auf Metallstempel aufgebracht, entsprechend ausgerichtet und durch Kälteeinwirkung fixiert. Mit einem Gefriermikrotom wurden 10-20 µm dünne Querschnitte der Gewebe angefertigt, direkt auf Objektträger übertragen und bei -18 °C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit -20 °C kaltem Aceton für 10 min fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Absättigung unspezifischer Bindungs-

stellen über Nacht bei 4 °C mit einer wässrigen Dispersion, die 5 % Magermilchpulver (Heirler Cenovis, D-Randolfzell) und 1 % Triton X-100 (ICN, D-Eschwege) enthielt, behandelt. Es wurde mit PBS gewaschen und zur Inaktivierung gewebeeigener Peroxidasen mit einer Lösung, die aus 4 Teilen Methanol und 1 Teil 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestand, für 10 min behandelt. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Schnitte mit einem Anti-Laminin (Rb) Antikörper (Sigma, D-Steinheim) als primärem Antikörper, der 1:20 in einer 5 % Magermilchpulverdispersion und 1 % Triton X-100 verdünnt worden war, überschichtet und für 3 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Rabbit IgG (Gt) Antikörper (Sigma) als sekundärem Antikörper, der 1:20 verdünnt in 5 % Magermilchpulverdispersion vorlag, für 1,5 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur behandelt. Die Detektion erfolgte mittels einer Diaminobenzidin (DAB)-Farbreaktion als braunes Farbpräzipitat. Hierzu wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS Sigma Fast DAB + Metallenhancer (Sigma, D-Steinheim), das zusätzlich Cobaltchlorid enthielt, eingesetzt. Ein positiver Nachweis führte hierbei zu einem unlöslichen dunkelblauen bis schwarzen Farbpräzipitat als Endprodukt, das lichtmikroskopisch ausgewertet werden konnte.

### **3.2.3.5. Rheologische Untersuchungen der Hautmodelle**

Um die Kontraktion der Hautmodelle über die Dauer der Kultivierung zu erfassen und Veränderungen im Hautmodell z.B. durch die Cokultivierung mit Sebozyten oder den Einsatz eines kommerziell erhältlichen Kollagens zu erkennen, wurden die Hautmodelle nach 7, 14, 21 und 28 Tagen der Kultivierung rheologisch untersucht. Die Messung erfolgte mit einer Platte-Platte-Einrichtung PP 20 (Durchmesser der Platte: 20 mm) des Rheometers CSR der Firma Bohlin Instruments (D-Mühlacker) isotherm bei 20 °C. Die Spaltbreite wurde für jedes Hautmodell auf 2/3 der Dicke eingestellt und variierte durch die Kontraktion des Kollagengels über die Dauer der Kultivierung zwischen ca. 1500 µm nach 7 Tagen und ca. 200 µm nach 28 Tagen Kultivierung.

Die Messung erfolgte im linear viskoelastischen Bereich bei einer Schubspannung von 7,5 Pa und einer Frequenz von 1,5 Hz. Nach einer Vorscherzeit von 2 Minuten mit 7,5 Pa erfolgte die eigentliche Messung über 100 s. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Schwingungsrheometrie und ihren Messparametern Speichermodul G', Verlustmodul G'' und Phasenverschiebung  $\delta$  über die Softwaremodule Oscillation und Data Processing (Bohlin Instruments, D-Mühlacker).

### **3.2.3.6.      Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Die thermoanalytischen Untersuchungen wurden an einer DSC 220 C mit Diskstation 5200 H (Seiko, J-Tokio) durchgeführt. Zur Kalibrierung der Enthalpie und Temperatur wurden Indium und Zinn verwendet. Die Proben wurden in kaltverschweißten Aluminiumtiegeln (Thermo Haake, D-Karlsruhe) gegen luftgefüllte Referenztiegel mit einer Standardheizrate von 5 K/min vermessen. Im Exsiccator getrocknete ASC wurden zur Messung gefaltet und in die Tiegel eingelegt. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von -20 bis 120 °C durchgeführt.

### **3.2.3.7.      Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)**

Die Röntgenweitwinkelmessungen erfolgten an hydratisierten Hautmodellen unter Verwendung einer Debeye-Scherrer-Kamera (Umfang: 360 mm). Die Hautmodelle wurden in röntgenamorphen Kapillaren (Glas, D-Berlin) mit einem Durchmesser von 0,5 mm eingebracht und 24 Stunden lang vermessen. Zur Erzeugung der Strahlung wurde ein Röntgenerators PW 1830 (Philips, D-Kassel) mit einer Röntgenröhre PW 2253/11 (Cu K  $\alpha$ ,  $\lambda = 0,154$  nm, Beschleunigungsspannung 40 kV, Anodenstrom 40 mA, Philips, D-Kassel) benutzt. Die Interferenzen wurden durch die Schwärzung eines Röntgenfilms Fuji 100 (Fuji, J-Tokio) detektiert. Die Durchmesser der geschwärzten Ringe wurden vermessen und die Netzebenenabstände anhand der registrierten Interferenzen über die Bragg'sche Gleichung berechnet (Gleichung 3.1):

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

$\lambda$  = Wellenlänge der Röntgenstrahlung

$n$  = Ordnung der Interferenz

$d$  = Netzebenenabstand

$\theta$  = Glanzwinkel

*Gleichung 3.1.*

### **3.2.3.8. Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)**

SAXD-Untersuchungen wurden in einer Lochblendenkamera nach Kiessig (Institutseigenbau) durchgeführt. Als Röntgenquelle diente hier eine Feinfokus-Röntgenröhre PW 2213-25 mit Cu-Anode, die von einem Röntgengenerator PW 1710 (beides Philips, D-Kassel) mit einer Spannung von  $U = 40 \text{ kV}$  und einem Strom von  $I = 25 \text{ mA}$  versorgt wurde. Die Beugungsbilder wurden mit einem OED-50M mit ASA-SAX-Karte aufgenommen. Die Datenausgabe erfolgte über die Software ASA (alles MBraun, D-Garching). Zur Verhinderung von Störstrahlung wurde die Messkammer evakuiert. Alle Proben wurden in speziell konstruierte Probenträger eingefüllt (Institutseigenbau). Die Berechnung der Netzebenenabstände erfolgte ebenfalls über die Bragg'sche Beziehung (Gleichung 3.1).

### **3.2.4. Exzidiertes Stratum corneum**

Zur Isolierung des Stratum corneums wurde ausschließlich gesundes Gewebe der Abdominalregion von weiblichen Patienten verwendet, das in der plastischen Chirurgie angefallen war. Es wurde nur die Haut einer Spenderin benutzt.

Die Haut wurde direkt nach der Entnahme gekühlt und vom Unterhautfettgewebe mechanisch mit einem Skalpell befreit. Anschließend wurden die Hautstücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-25 \text{ °C}$  bis zur weiteren Präparation vor Versuchsbeginn gelagert. Zur Gewinnung des isolierten Stratum corneums wurden die Hautstücke mit Trypsin behandelt [Kligman und Christophers, 1963]. Die Hautstücke wurden mit der Dermisseite auf Zellstoff gelegt, der zuvor mit wässriger 2 %iger (m/V) Trypsinlösung (Pankreasprotease, Merck, D-Darmstadt) getränkt worden war. Nach einer Inkubation für 24 Stunden bei  $37 \text{ °C}$  ließ sich das Stratum corneum leicht mit einer stumpfen Pinzette abheben. Um eine weitere enzymatische Zersetzung des Stratum corneum zu verhindern, wurde es in 0,01 %iger (m/V) Trypsin-Inhibitorlösung (Type II-O: Chicken egg white, Sigma, D-Steinheim) sowie anschließend mehrmals in Wasser gewaschen, auf einem Teflonsieb im Exsiccator über Blaugel getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Stratum corneum wurde nicht länger als 4 Wochen nach der Isolierung verwendet, um zersetzungsbedingte Veränderungen während der Lagerung zu vermeiden.

### 3.2.5. Permeationsuntersuchungen

Zur Bestimmung der Permeabilität der Hautmodelle und von exzidiertem Stratum corneum wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt. Es wurde die Menge an Arzneistoff untersucht, die in Abhängigkeit der Zeit durch die Hautmodelle bzw. die Exzidate permeierte. Diese Experimente wurden zum größten Teil mit einer modifizierten Franz-Zelle (Abbildung 3.2) durchgeführt [Franz, 1975], wobei als Donator die in Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Fertigarzneimittel eingesetzt wurden. Als Akzeptormedium diente ein salinischer Phosphatpuffer, der durch ein Wasserbad auf 37 °C temperiert wurde.

Die Permeationsfläche betrug für die Permeation durch die Hautmodelle 4,9 mm<sup>2</sup> und das Akzeptorvolumen lag zwischen 5,7 und 6,4 ml. Für das exzidierte Stratum corneum betrug die Permeationsfläche ca. 50 mm<sup>2</sup> und das Akzeptorvolumen 4,3 bis 5,8 ml. Während der Dauer des gesamten Permeationsexperimentes wurde mittels eines Magnetrührers (400 min<sup>-1</sup>) für eine gleichmäßige Durchmischung des Akzeptors gesorgt. Die Probenentnahme von 250 µl erfolgte bis zur Stunde 8 stündlich bzw. bei einigen Experimenten alle 2 Stunden und zusätzlich nach 24, 26 und 28 Stunden, wobei die Probenvolumina durch reinen PBS wieder ersetzt wurden. Um ein Verdunsten insbesondere von Akzeptorflüssigkeit während der Versuchsdauer zu verhindern, wurden die Öffnungen der Franz-Zelle mit Parafilm und Tesafilm abgedichtet.

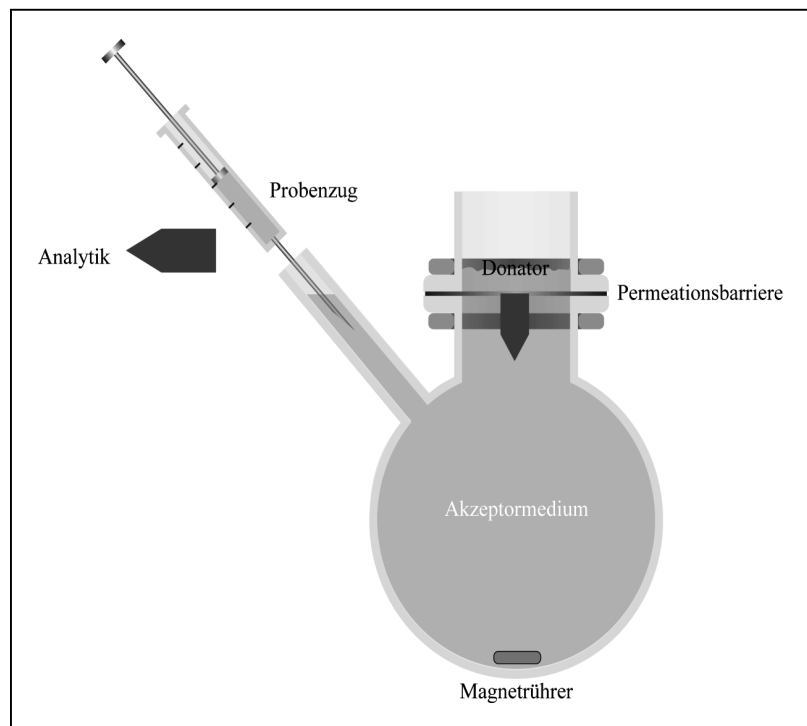


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der modifizierten Franz-Zelle

Für die Permeationsuntersuchungen in den verschiedenen Kultivierungsstadien wurden die Hautmodelle in den Sixwell Einsätzen der Transwells (Costar, D-Fernwald) belassen. Um eine definierte Auftragsfläche zu erhalten, wurden Lochringe mit einem Durchmesser von 5 mm auf die Oberfläche geklebt und in deren Mitte die Zubereitung aufgetragen. Das Volumen an Akzeptormedium unterhalb der Filtermembran betrug ca. 3 ml. Die Permeation wurde bei Raumtemperatur und in Anlehnung an die Permeationsuntersuchungen in der modifizierten Franz-Zelle im Inkubator bei 37 °C durchgeführt. Um auch bei diesem Aufbau ein Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Akzeptor zu vermeiden, wurden die Transwells mit Hilfe des Deckels verschlossen. Der Probenzug (250 µl) aus dem Akzeptorkompartiment erfolgte nach 2, 4, 6, 8, 24, 26 und 28 Stunden.

### 3.2.6. HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe

Die permeierte Menge an Arzneistoff wurde mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System der Firma Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus (Probenauftrag 20-40 µl) und einem UV-Detektor 486 zusammengesetzt war. Die Auswertung erfolgte mit einer Waters Millennium 32 Chromatography Manager Software (Waters).

**Ibuprofen:** Reversed Phase RP Säule Hypersil ODS 5 µm 125 x 4 mm (Grom, D-Rottenburg-Hailfingen), mobile Phase: 54 T Wasser, 46 T Acetonitril (Acros Organics) und 2 T Essigsäure (Merck) [Levine und Caplan, 1985; Wassermann und Müller-Goymann, 2000a], Flussrate: 1,7 ml/min, Retentionszeit: 4,8 min, Detektion: Wellenlänge  $\lambda$  = 246 nm, Mehrpunktkalibrierung im Bereich 1-25 µg/ml (Korrelationskoeffizient > 0,999).

**Clindamycin:** Reversed Phase RP Säule Nukleosil 100-10 C<sub>8</sub> 250 x 4,6 mm (Macherey-Nagel, D-Düren), mobile Phase: 77,5 T isotonischer Phosphatpuffer pH 2,5 und 22,5 T Acetonitril, Flussrate: 1,0 ml/min, Retentionszeit: 7,2 min, Detektion: Wellenlänge  $\lambda$  = 210 nm, Mehrpunktkalibrierung im Bereich 1-10 µg/ml (Korrelationskoeffizient > 0,999).

## **4. Versuchsergebnisse und Diskussion**

### **4.1. Kultivierung und Charakterisierung der dermalen Zelllinien**

Für die Herstellung der organotypischen Hautmodelle wurden 3 verschiedene Zellarten verwendet- als epidermale Zellen die HaCaT-Zelllinie und als dermale Zellen native humane Fibroblasten. Außerdem wurde die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 sowohl im Dermis- als auch im Epidermisäquivalent eingesetzt.

#### **4.1.1. Kultivierung der dermalen Zelllinien**

##### **4.1.1.1. Fibroblasten**

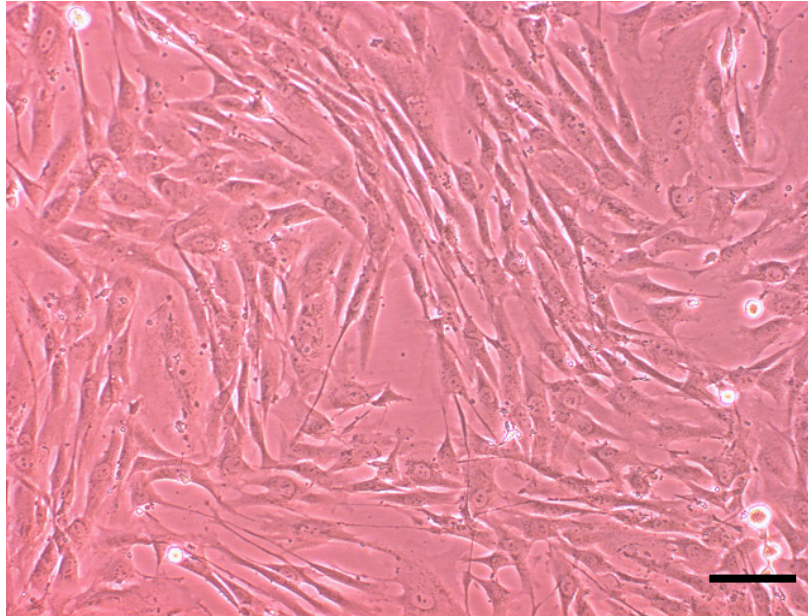
Die humanen Fibroblasten (HDF) wurden schon in der Arbeit von Specht (1998) zusammen mit der HaCaT-Zelllinie zur Herstellung organotypischer Hautmodelle eingesetzt. In Monolayerkultur zeichnen sich die HDF durch eine unregelmäßige Gestalt mit einer Längsorientierung aus. Auch im konfluenten Zustand der Kulturen behalten die Zellen ihre spindelförmige Ausrichtung bei (Abbildung 4.1), sie wachsen in Kultur nur einschichtig und zeigen im Gegensatz zu Keratinozyten niemals eine Ausbildung zu Multilayern. Da es sich um native Zellen handelt, sind die HDF nur begrenzt kultivierbar. Für die Versuche dieser Arbeit wurden Zellen der Passage 6-12 verwendet.

##### **4.1.1.2. Keratinozyten**

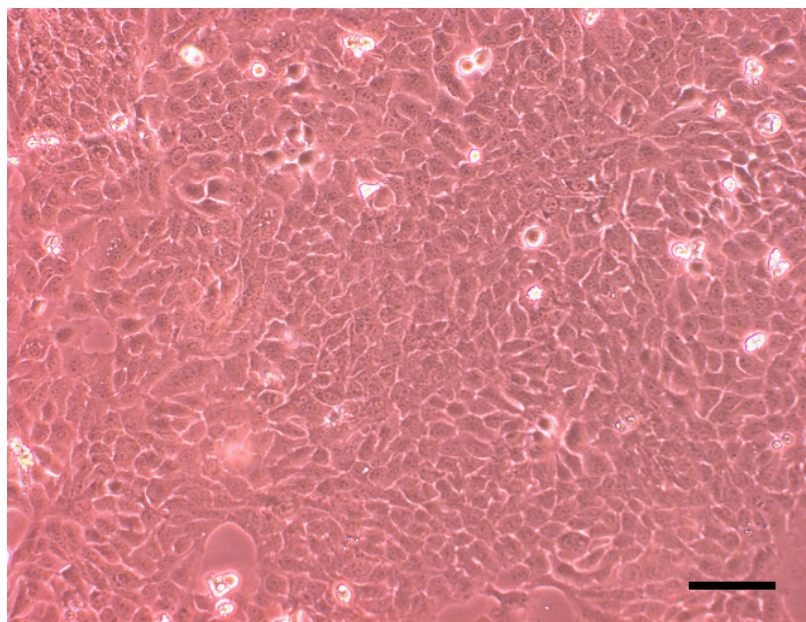
Die transformierten HaCaT-Zellen, die ebenfalls von Specht (1998) verwendet wurden, zeigen im Monolayer die typische polygonale Morphologie epidermaler Zellen in Kultur (Abbildung 4.2). Zusätzlich sind im Monolayer vereinzelt vielkernige Riesenzellen zu finden, die für diese Zelllinie charakteristisch sind [Boukamp et al., 1988]. Bei einer Kultivierung über den konfluenten Status hinaus, sind die HaCaT-Zellen ebenso wie native humane Keratinozyten in der Lage mehrschichtig zu wachsen. Des weiteren können auch z.T. Abschilferungs- und Verhornungstendenzen auftreten, die allerdings abhängig vom Calciumgehalt des Mediums sind. Eine Anwesenheit von Calcium fördert die Stratifizierung und kann zu einer erschwerten Subkultivierung führen [Parentau, 1994], so dass aus diesem Grund bei der Monolayerkultivierung ein calciumfreies Medium verwendet wird, während bei



der Herstellung der organotypischen Hautmodelle dem Medium Calcium zugesetzt wird, da hierbei ein mehrschichtiges Wachstum mit einer Stratifizierung der obersten Schichten erreicht werden soll.



*Abbildung 4.1: humane dermale Fibroblasten in subkonfluentem Zustand, lichtmikroskopische Aufnahme, Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$*



*Abbildung 4.2: HaCaT-Zellen als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast in Kultur, Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$*

#### 4.1.1.3. Sebozyten

Die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 zeigte in Kultur Zellen unterschiedlicher Größe sowie zahlreiche Lipidtropfen im Zytoplasma der Zellen und im umgebenden Medium. Das polygonale Erscheinungsbild wies eine deutliche Ähnlichkeit zu den Keratinozyten (Abbildung 4.3) auf, allerdings erfolgte das Wachstum langsamer als bei den Keratinozyten und interzelluläre Kontakte waren nicht so stark ausgeprägt, wodurch die Zellen häufig nur ein subkonfluentes Stadium erreichten. Auch eine längere Kultivierung zeigte keine Konfluenz sondern es bildeten sich nur größere konfluente Bereiche der Zellen im Monolayer aus.

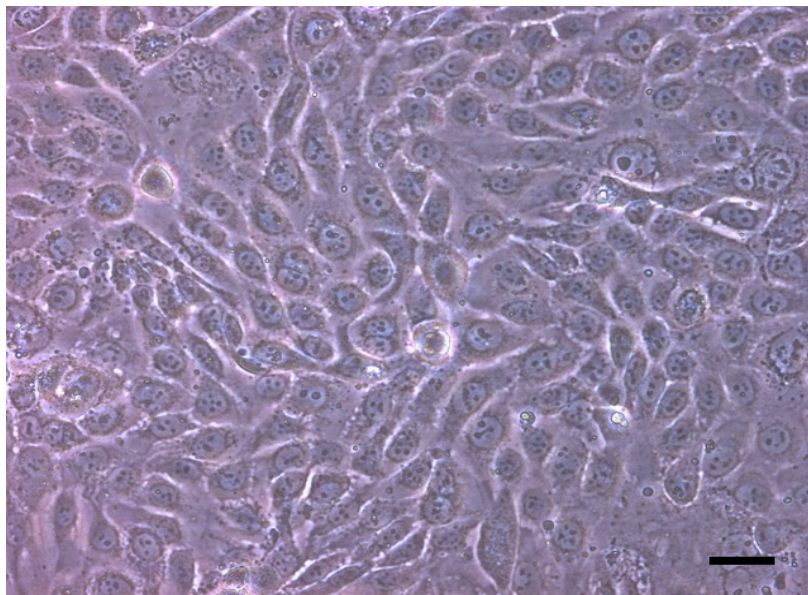


Abbildung 4.3: Sebozytenzelllinie als Monolayer kultiviert, lichtmikroskopische Aufnahme, Balkenlänge entspricht 50  $\mu\text{m}$

#### 4.1.2. Wachstumsverhalten der dermalen Zelllinien

Um das Wachstumsverhalten der Zellen in den unterschiedlichen Medien zu charakterisieren wurden Wachstumskurven wie in Abschnitt 3.2.1.5. beschrieben aufgenommen. Aus den erhaltenen sigmoiden Wachstumskurven lassen sich typische Parameter ersehen, mit denen sich der Zustand einer Kultur beschreiben lässt. Ein Wachstumszyklus beginnt mit einer Latenz-Phase (lag-Phase). In dieser Zeit nach der Aussaat der Zellen nimmt die Zellzahl nicht oder kaum zu. Sie stellt eine Adaptionsphase dar, während der die Zellen sich an das neue Substrat anheften, ausbreiten sowie Enzyme und DNA zur Zellreproduktion neu

synthetisieren. Daran anschließend folgt die exponentielle Phase (log-Phase), in der die Zellzahl exponentiell zunimmt. In diesem Bereich lässt sich die Populationsverdoppelungszeit der Kultur bestimmen. Gegen Ende der log-Phase wird die Kultur konfluent, und die Wachstumsrate ist reduziert, es beginnt die stationäre oder Plateau-Phase. An diesem Punkt lässt sich die Sättigungsdichte der Kultur berechnen.

#### 4.1.2.1. Wachstumsverhalten der humanen dermalen Fibroblasten

Die Wachstumskurve der humanen dermalen Fibroblasten in DMEM Wachstumsmedium unter den in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Kultivierungsbedingungen ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

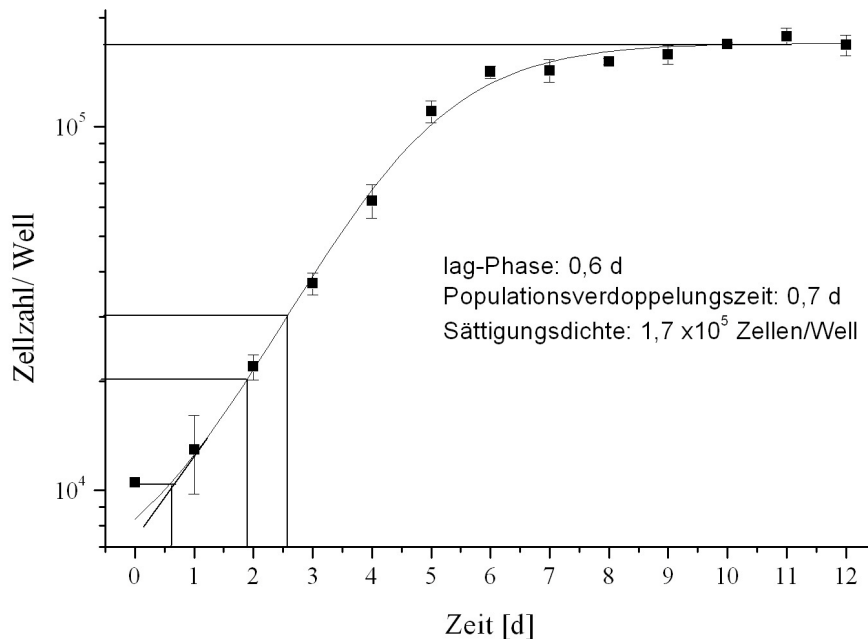


Abbildung 4.4: Wachstum der humanen dermalen Fibroblasten in DMEM Wachstumsmedium, ( $n=6$ , bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von  $2,01 \text{ cm}^2$  pro Well)

Die Abbildung 4.4 zeigt den typischen sigmoiden Verlauf des Wachstums adhärenter Zellen in einer stabilen Kultur. Nach einer durchschnittlichen Latenzphase von 0,6 Tagen geht die Kultur in die log-Phase mit einer Populationsverdoppelungszeit von 0,7 Tagen und erreicht ihr Plateau etwa 9 Tage nach Aussaat. Die Kultur zeigte im Vergleich zu den Wachstumsuntersuchungen von Specht (1998) eine vergleichbare lag-Phase, allerdings eine

um mehr als die Hälfte reduzierte log-Phase. Die Populationsverdoppelungszeit verkürzte sich von 1,9 auf 0,7 Tage. Offensichtlich sind keine Zeichen der Alterung der Zellen erkennbar.

#### 4.1.2.2. Wachstumsverhalten der HaCaT-Zelllinie

Auch die HaCaT-Zellen zeigten ein gutes Wachstum unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 4.5). Nach einer Latenz-Phase von 1,8 Tagen zeigten die immortalisierten Zellen mit 0,6 Tagen eine kürzere Populationsverdoppelungszeit, entsprechend einer höheren Verdoppelungsgeschwindigkeit, als vor 8 Jahren mit 0,9 Tagen. Es wurde bereits nach 7 Tagen eine Sättigungsdichte erreicht, die mit  $8,7 \times 10^5$  Zellen/Well deutlich höher liegt als bei den HDF.

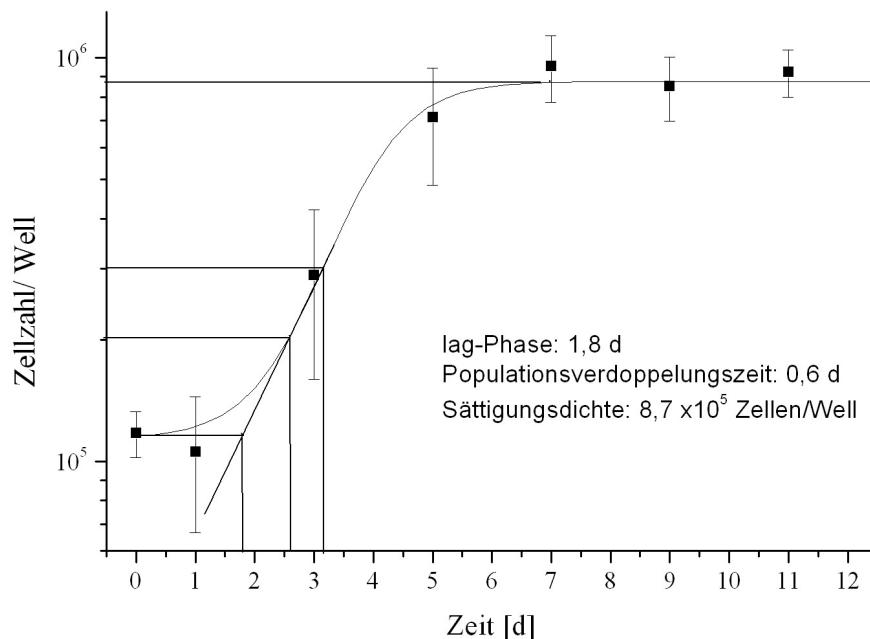


Abbildung 4.5: Wachstum der HaCaT-Zellen in DMEM Wachstumsmedium, ( $n=6$ , bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von  $2,01 \text{ cm}^2$  pro Well)

#### 4.1.2.3. Wachstumsverhalten der Sebozytenzelllinie SZ 95

In Abbildung 4.6 ist abschließend die Wachstumskurve für die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 dargestellt. Diese Zellen zeigten das langsamste Wachstum der 3 Zelllinien, erst nach einer lag-Phase von 2,5 Tagen ist eine Populationsverdoppelungszeit

von 1,3 Tagen und erst nach 19 Tagen ist die Sättigungsdichte erreicht, die wiederum noch einmal höher liegt als bei den HaCaT-Zellen.

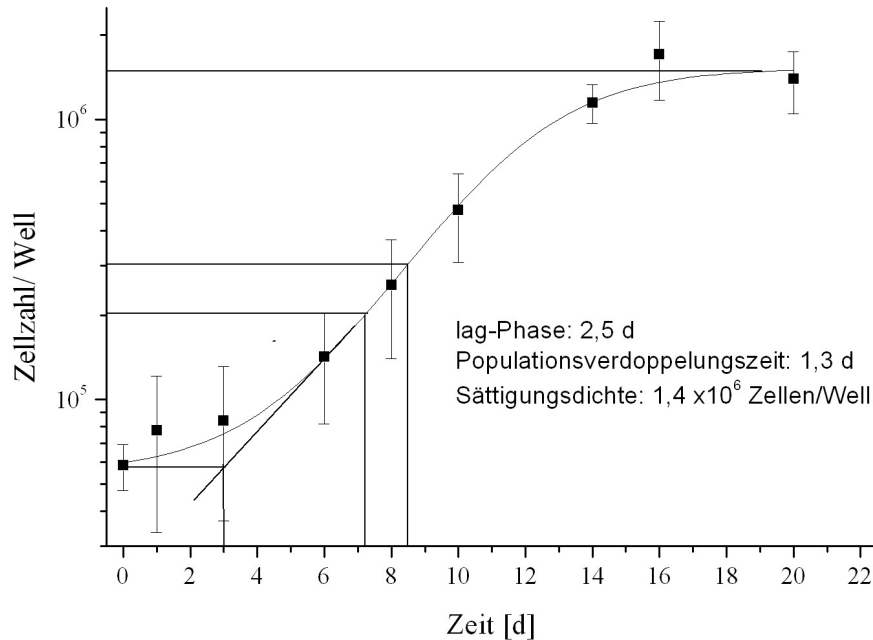


Abbildung 4.6: Wachstum der Sebozytenzelllinie SZ 95 in Sebomed-Wachstumsmedium, ( $n=6$ , bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von  $2,01 \text{ cm}^2$  pro Well)

#### 4.1.3. Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der dermalen Zelllinien

Die HDF- und HaCaT-Zelllinien sind seit über 10 Jahren in unserem Institut in Kultur, und es sind keine Veränderungen sowohl in der morphologischen Erscheinung als auch im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien zu beobachten.

Es ist des weiteren gelungen die Sebozytenzelllinie SZ 95 in unserem Institut zu etablieren, wenn auch die Wachstumsversuche eine deutlich reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien und zu den Untersuchungen von Zouboulis et al. (1999) zeigten. Es wurde bei den Wachstumsversuchen bei allen Zelllinien die gleiche Ausgangskonzentration gewählt, während bei der Kultivierung im Hinblick auf maximale Zellausbeute nach dem Passagieren im Vergleich zu den HDF und HaCaT-Zellen deutlich mehr Zellen der Sebozytenzelllinie SZ 95 in die nächste Kulturflasche eingesät wurden, so dass sich ein vergleichbarer Zeitraum bis zur nächsten Passage ergab.



## **4.2. Aufbau der humanen Hautmodelle**

Ziel der Entwicklung war es aus humanen dermalen Fibroblasten und der immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT in Anlehnung an die Untersuchungen von Specht (1998) in vitro ein mehrschichtiges Hautäquivalent aufzubauen und es um die Sebozytenzelllinie SZ 95 zu erweitern. Des weiteren sollte es hinsichtlich verschiedener Parameter, insbesondere der Permeationsbarriere mit dem Originalgewebe verglichen werden.

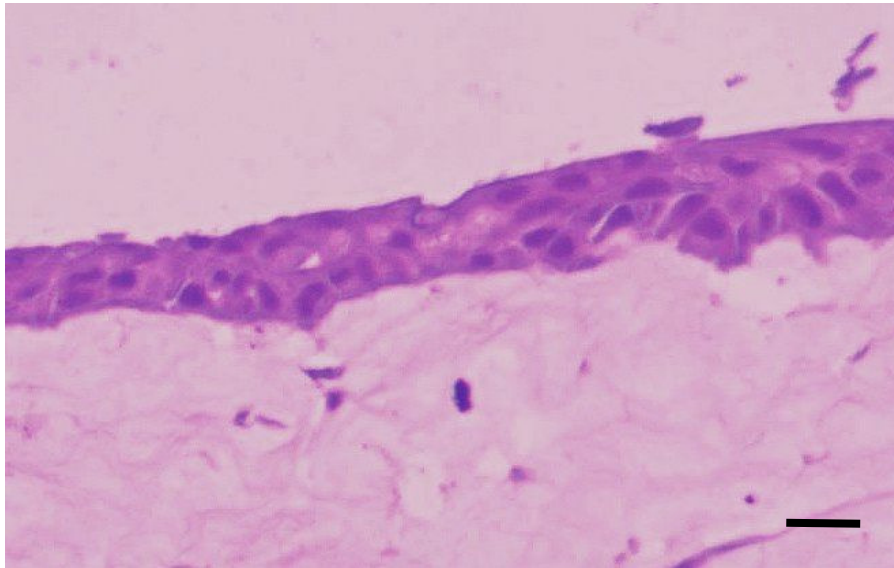
Specht (1998) beschrieb eine Kultivierung der dermalen Zellen in Transwell-Membran-Einsätzen, die eine Versorgung des Konstruktes mit Medium von oben und unten ermöglichen. Außerdem kann das Konstrukt zur Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis an die Luft-Medium-Grenze gehoben werden. Da sich diese Art der Kultivierung auch mit anderen Zellen zur Herstellung organotypischer Äquivalente bewährt hat [Tegtmeyer, 2000; Reichl, 2003] wurde diese Methode beibehalten und nur in wenigen Punkten modifiziert (s. Abschnitt 3.2.2.).

### **4.2.1. Hautmodell aus Fibroblasten und Keratinozyten**

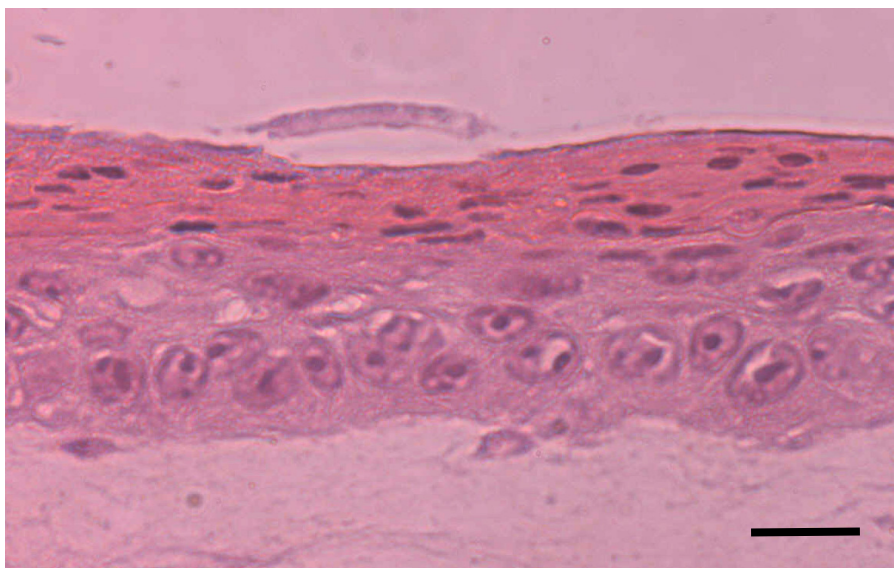
Als Dermisäquivalent wurde eine Biomatrix, die aus Kollagen Typ I aufgebaut war und humane dermale Fibroblasten enthielt, auf die Filter der Transwell-Membran-Einsätze aufgebracht. Die Eignung von Kollagengelen für die Kultivierung dreidimensionaler dermaler oder cornealer Äquivalente konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden [Specht, 1998; Reichl, 2003]. In Abhängigkeit der Kollagen- und Fibroblastenkonzentration kam es im Laufe der Kultivierung zu einer Kontraktion des Gels, wobei hohe Zellkonzentrationen und geringe Proteinkonzentrationen die Kontraktion des Gels verstärkten, während durch höhere Kollagenkonzentrationen stabilere Gele erhalten wurden. Als Ursache für die Kontraktion des Gels wird die Lebensfähigkeit der Fibroblasten genannt, wobei die genaue Ursache noch nicht abschließend geklärt ist. Als mögliche Ursache gibt Alberts (1995) an, dass die Fibroblasten in einem Geflecht zufallsorientierter Kollagenfibrillen das Kollagen aus der Umgebung zusammenziehen und packen, bis dieses nur noch einen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens einnimmt.

Nach Aufsäen der Keratinozyten entstand nach 1 Woche submerser Kultivierung auf dem fibroblastenhaltigen Kollagengel ein konfluenter Monolayer, der durch die Anhebung des Transwell-Membran-Einsatzes und Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze für weitere 14 Tage eine mehrschichtige Epidermis ausbildete.

In Abbildung 4.7 ist nach insgesamt 3 Wochen Kultivierung schon ein mehrschichtiges Wachstum der HaCaT-Zellen auf dem Dermisäquivalent zu erkennen. Nach 4 Wochen Kultivierung (Abbildung 4.8) haben sich deutlich mehr Zellschichten auf dem Dermisäquivalent gebildet, die Zellen flachen nach oben hin ab, und es ist eine leichte Stratifizierung zu erkennen. Verglichen mit einem Querschnitt durch die Haut (Abbildung 4.9) ist allerdings kein ausgeprägtes Stratum corneum entstanden.



*Abbildung 4.7: Querschnitt durch ein humanes Hautmodell nach 3 Wochen Kultivierung, H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 50  $\mu$ m*



*Abbildung 4.8: Querschnitt durch ein humanes Hautmodell nach 4 Wochen Kultivierung H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 20  $\mu$ m*

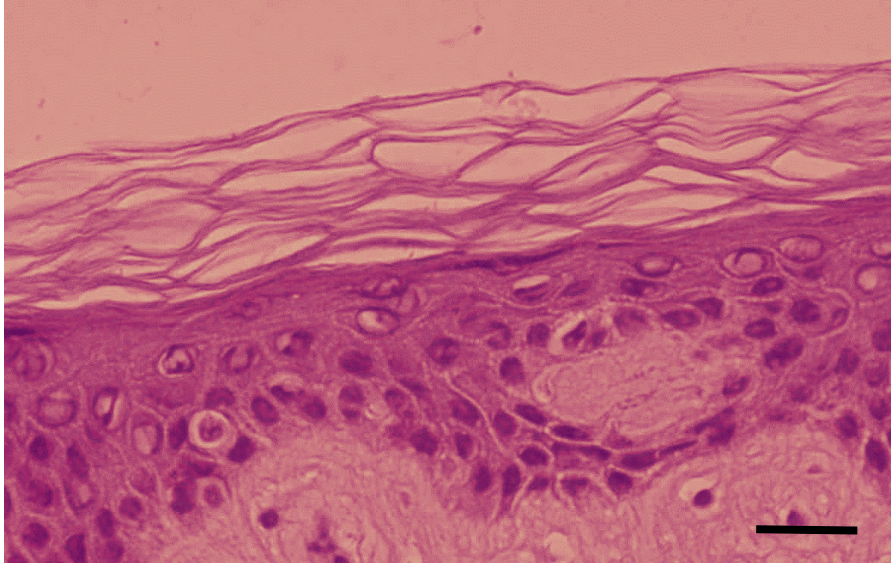


Abbildung 4.9: Querschnitt durch die menschliche Haut, H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 20  $\mu\text{m}$

#### 4.2.2. Inkorporation der Sebozyten

Die Sebozytenzelllinie SZ 95 wurde sowohl im Dermis- als auch im Epidermisäquivalent inkorporiert. Dazu wurde sie zum einen gemeinsam mit den Fibroblasten im Kollagengel ausgegossen und zum anderen gemeinsam mit den Keratinozyten auf das kontrahierte Kollagengel aufgesät. Die Anwesenheit der Sebozyten im Kollagengel führte zu keiner Beeinflussung der Kontraktion, wie in späteren rheologischen Untersuchungen (s. Abschnitt 4.3.5) gezeigt werden konnte. Da die Sebozyten mengenmäßig in der Haut den Keratinozyten und Fibroblasten unterlegen sind, wurden sie für die folgenden Versuche im Verhältnis 1:3 mit der jeweils anderen Zellart eingesetzt. Inwiefern die Inkorporation der Sebozyten insbesondere die Permeationseigenschaften der Hautmodelle verändert wird im Abschnitt 4.4 gezeigt.

#### 4.2.3. Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau der humanen Hautmodelle

Die für den Aufbau des Hautmodells verwendeten Zellen der HaCaT-Zelllinie sind spontan immortalisierte Zellen, die ihre Kapazität zur vollständigen epidermalen Differenzierung bewahrt haben und auch die Fähigkeit besitzen eine strukturierte Epidermis nach Transplantation in vivo zu rekonstruieren [Boukamp, et al., 1988]. Im Vergleich mit nativen



Keratinocyten zeigen die HaCaT-Zellen vergleichbare Eigenschaften. Sie haben u.a. den gleichen Gesamtgehalt an Lipiden und zeigen beide bei einem geringen Calciumgehalt des Mediums eine verzögerte Differenzierung, während ab einer Konzentration von 1,6 mM Calcium verschiedene Differenzierungsprozesse stattfinden. Allerdings gibt es in der Regulation der Sterolsynthese durch LDL Unterschiede, die sich in einer verringerten Differenzierungskapazität der HaCaT-Zellen verglichen mit nativen Keratinocyten äußert. Außerdem konnten geringe Unterschiede im Phospholipidgehalt nachgewiesen werden [Schürer et al., 1993].

Im Querschnitt durch das humane Hautmodell (Abbildung 4.7) ist deutlich zu erkennen, dass die HaCaT-Zellen mehrschichtig auf dem Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten wachsen. Des weiteren ist ein Abflachen nach oben hin zu erkennen, so dass von einer Differenzierung und auch von einer beginnenden Stratifizierung ausgegangen werden kann. Ein großer Vorteil der immortalisierten HaCaT-Zelllinie ist die unbegrenzte Verfügbarkeit und die nicht vorhandene Alterung der Zellen, so dass für die Herstellung der Hautmodelle gleichbleibendes Material eingesetzt werden kann.

Allerdings konnte die von Specht (1998) gefundene Stratifizierung der Epidermis mit einem ausgeprägtem Stratum corneum nicht reproduziert werden, und auch eine genaue Abgrenzung der unterschiedlichen Schichten der Epidermis in Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum erscheint nicht möglich.

Im Hinblick auf die Ergebnisse von Boelsma et al. (1999) sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht verwunderlich. Sie konnten zeigen, dass die HaCaT-Zellen ein breiteres Spektrum an Keratinen als native Keratinocyten exprimieren und bei der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze ein vergleichbares Keratinmuster aufweisen wie z.B. submers kulivierte native Keratinocyten oder frühe fetale Epidermis (< 15 Wochen). Durch die Abwesenheit von klar strukturierten und verhornten Zelllagen und einem nur geringen Gehalt an Ceramiden und Glycosphingolipiden zeigt sich eine Ähnlichkeit zu unreifem oder „nassem“ Epithel [Williams et al., 1988]. Insgesamt ist die epidermale Differenzierung der HaCaT-Zellen unvollständig, da die wichtigsten Schritte wie die Formation eines Stratum granulosums und Stratum corneums nicht erreicht werden [Boelsma et al., 1999]. Dabei haben weder das Substrat, auf dem die HaCaT-Zellen kultiviert werden, noch die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess. Dass die HaCaT-Zellen zwar viele differenzierungsspezifische Proteinmarker exprimieren (wie z.B. Keratin 1, Keratin 10, Involucrin und Filaggrin), obwohl sie nur unvollständig differenzieren, wurde schon 1989 von Ryle et al. gezeigt.

### **4.3. Charakterisierung der organotypischen Hautmodelle**

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Morphologie und Histologie waren weitere Charakterisierungen der Konstrukte für die Vergleichbarkeit mit dem Originalgewebe notwendig. Specht (1998) konnte zeigen, dass im Hautmodell, aufgebaut aus Fibroblasten und HaCaT-Zellen, in Bezug auf die Keratinexpression die HaCaT-Zellen mit nativen Keratinozyten vergleichbar sind, wodurch der Einsatz der immortalisierten Zelllinie als gerechtfertigt erscheint. Weitere Vorteile der immortalisierten Zelllinie stellen das gleichbleibende Zellmaterial dar und die ständige Verfügbarkeit. In Western-Blot Untersuchungen konnten neben den spezifischen Keratinen K1 und K10 sowohl mit den HaCaT-Zellen als auch mit nativen Keratinozyten die Expression weiterer Keratine gezeigt werden, die normalerweise nicht in der Epidermis vorhanden sind. Dadurch wird deutlich, dass Unterschiede zwischen den Hautmodellen und nativer humaner Epidermis bestehen, die z.B. durch eine Hyperproliferation der Kulturen gekennzeichnet sind.

Als weitere Charakterisierungsmethode wurden in der vorliegenden Arbeit der Nachweis der Basalmembrankomponente Laminin herangezogen, sowie Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen, die Aufschlüsse über die Ausbildung ultrastruktureller Merkmale der obersten Hautschicht bringen sollten. Des weiteren wurde versucht mit Hilfe thermoanalytischer und röntgenographischer Methoden eine Vergleichbarkeit zum Originalgewebe darzustellen. Untersuchungen zum Lipidgehalt der Hautmodelle sollten u.a. zeigen, inwiefern sich durch die Inkorporation der Sebozyten das Lipidmuster der Hautmodelle verändert und dadurch von einer verbesserten Permeationsbarriere ausgegangen werden kann. Rheologische Untersuchungen wurden durchgeführt um die Kontraktion der Kollagengele nachweisen zu können und Einflüsse u.a. durch verschiedene Kollegenarten und den Zusatz der Sebozytenzelllinie SZ 95 im Hautmodell zu detektieren.

#### **4.3.1. Immunhistologischer Nachweis der Basalmembrankomponente Laminin**

Bei Basalmembranen handelt es sich um eine spezielle Struktur der extrazellulären Matrix an der Grenzfläche zwischen Epithel- und Bindegewebe. Diese Matrix besteht aus einem Netzwerk von Kollagen, hauptsächlich Typ IV, und Glykokonjugaten. Basalmembranbestandteile sind wichtig für die Anhaftung und Ausdifferenzierung der Epithelzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung nach Verletzungen des Epithelgewebes. Die Basalmembran der Haut, auch häufig als Basallamina bezeichnet, gehört zur sogenannten

dermoepidermalen Junctionszone. Dabei handelt es sich um eine Zone der Verankerung von Epidermis mit der Dermis. Die Basalzellen der Epidermis sitzen der bandenartigen Basalmembran auf. Dazwischen ist ein elektronenheller Zwischenraum, der dem epidermalen Interzellularraum analog ist und mit diesem kommuniziert, die Lamina lucida. Die Haftung der Basalzellen an der Basalmembran erfolgt durch sogenannte Halbdesmomen, die Haftung der Basalmembran am dermalen Kollagen durch eine besondere, morphologisch distinkte Faserform („anchoring fibrils“). Den Hauptteil der Lamina lucida füllt Laminin aus, ein nicht-kollagenes Protein (400 Kd) von kreuzförmiger Molekülform. Laminin besitzt Haftstellen für die Keratinozytenmembran, Kollagen IV und Heparin. Außerdem befinden sich in diesem Bereich noch Fibronectin, Nidogen und Entacin, alles Proteine mit multiplen Bindungseigenschaften. Die Basalmembran selbst besteht aus dem netzartigen Kollagen IV, das über verschiedene Fasersysteme mit dem Kollagengeflecht der Dermis verbunden ist. [Fritsch, 1990]

Der Nachweis der Basalmembran Komponente Laminin beim organotypischen Hautmodell erfolgte immunhistochemisch. Es zeigte sich eine deutliche Reaktion des Gewebes mit dem Antikörper. Das Vorhandensein von Laminin war an der tiefblauen bis schwarzen Färbung der Basalmembran zu detektieren. In Abbildung 4.10 ist Laminin als Bestandteil der Basalmembran im Hautmodell zwischen Dermis und Epidermis zu sehen. Allerdings ist der epidermale Bereich nur sehr schwach zu erkennen, da durch das häufige Waschen des dünnen Gefrierschnittes bei der Präparation die Epidermis leider nicht komplett erhalten blieb.

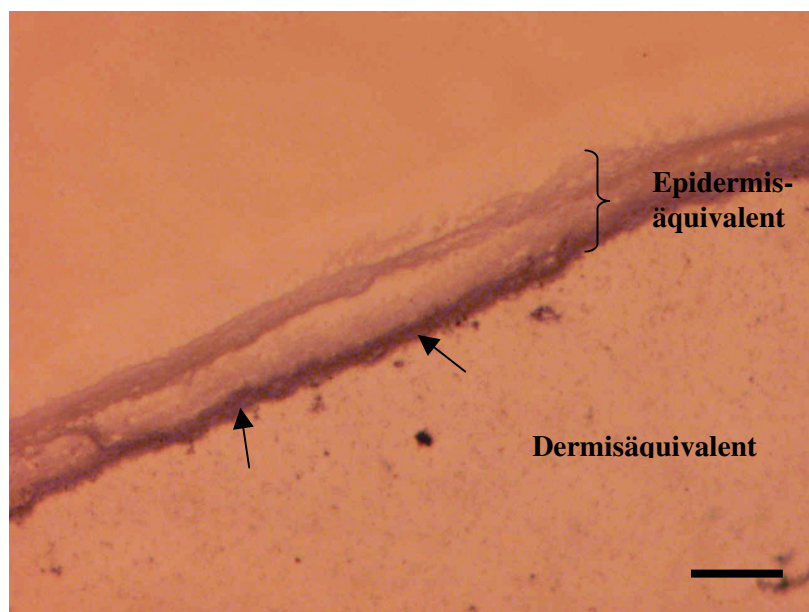


Abbildung 4.10: Nachweis der Basalmembran Komponente Laminin zwischen Dermis und Epidermis, Querschnitt durch das Hautmodell, Balkenlänge entspricht 40  $\mu\text{m}$

#### **4.3.2. Oberflächenstrukturen des humanen Hautmodells**

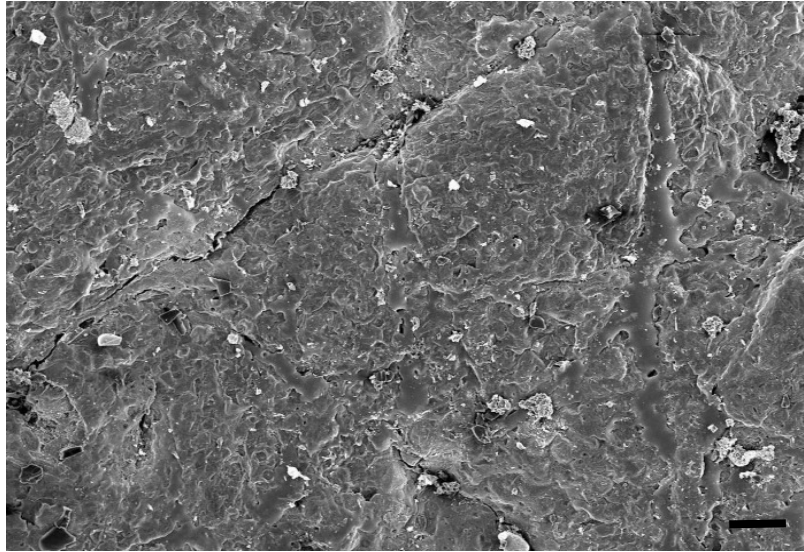
Um die Oberflächenstruktur der Haut und der humanen Hautmodelle zu untersuchen bzw. miteinander zu vergleichen, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die eine dreidimensionale Analyse der Ultrastruktur der Oberfläche erlauben.

Dazu wurden die Proben entsprechend einer mehrstufigen Methode nach Fujita et al. (1986) fixiert und zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit Hilfe einer Tannin-Osmium-Methode imprägniert, getrocknet und mit Gold besputtert. Das Stratum corneum wurde wie in Abschnitt 3.2.4. beschrieben isoliert und nach der Trocknung ohne weitere Aufbereitung besputtert. Wie in den folgenden Abbildungen zu sehen ist, ergaben die Untersuchungen wenig strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen dem Stratum corneum, den exzidierten Hautstücken und dem humanen Hautmodell. In den Abbildungen 4.11 und 4.12 sind die Oberflächen von exzidiierter Haut und dem Hautmodell in einer Übersichtsaufnahme dargestellt. Die Oberfläche der exzidierten Haut erscheint dabei deutlich strukturierter. Dieses Merkmal soll in der Darstellung der äußeren Hautschicht, des Stratum corneums, genauer betrachtet werden (Abbildung 4.13). Problematisch ist allerdings, dass die menschliche Epidermis in ihrer Struktur beträchtlich variiert. Die Form und Oberflächenstruktur der Zellen, die die oberflächliche Epidermisschicht bilden, sind in verschiedenen Körperregionen unterschiedlich ausgebildet [Fujita et al., 1986]. Üblich sind REM-Untersuchung der Hautoberfläche oder von Epidermiszellen, die mit Hilfe eines Cellophan-Klebefilms abgetragen und dann im REM betrachtet werden. Diese Methode kann auch in vivo angewendet werden. In unterschiedlichen Aufnahmen der Epidermis, zum einen an der Unterseite des Stratum corneums der Fingerbeere und zum anderen an der Fußsohle, zeigen sich platte, polygonale Hornschuppen, die noch an die ursprüngliche polyedrische Form der Zellen erinnern. An der Unterseite der Keratinozyten sind schuppenförmige Ausstülpungen zu erkennen, die als Microfoliae bezeichnet werden. Durch diese Microfoliae entsteht eine feste Verzahnung mit den Oberflächen der Nachbarzellen und damit ein Schutz vor mechanischer Schädigung [Fujita et al. 1986].

Die hier vorliegenden REM-Aufnahmen entstanden in Anlehnung an die Untersuchungen von Reichl (2003), der mit Hilfe der in Abschnitt 3.2.3.2 beschriebenen Aufbereitung die Endothel- und Epithelschichten von porciner Cornea mit einem porcinen und einem humanen Corneakonstrukt verglichen hat.

Vergleicht man die Oberfläche der äußersten Schicht der Haut, dem Stratum corneum, in Abbildung 4.13 mit der Oberfläche des Hautmodells in einer sehr viel höheren Vergrößerung

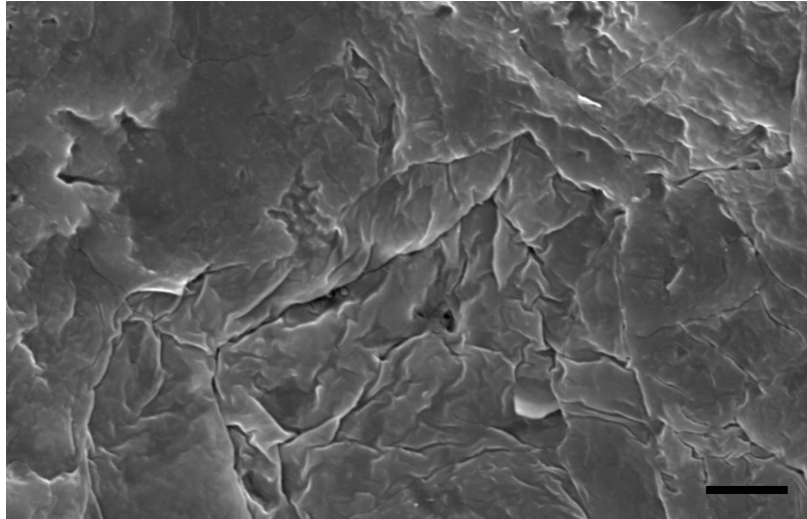
als in den vorherigen Abbildungen, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Im Stratum corneum sind abgeflachte Hornschuppen unterschiedlicher Form zu sehen, die miteinander nur in einem lockeren Kontakt stehen. Bei der Oberfläche des Hautmodells (Abbildung 4.14) ergab sich ein vergleichbares Bild wie bei Epithelzellen. Die Zellen zeigten eine dichte Epithelschicht, es sind keine abgeflachten Zellen vorhanden und die Zellen wiesen eher eine runde Form mit einer Vielzahl von Mikrovilli auf.



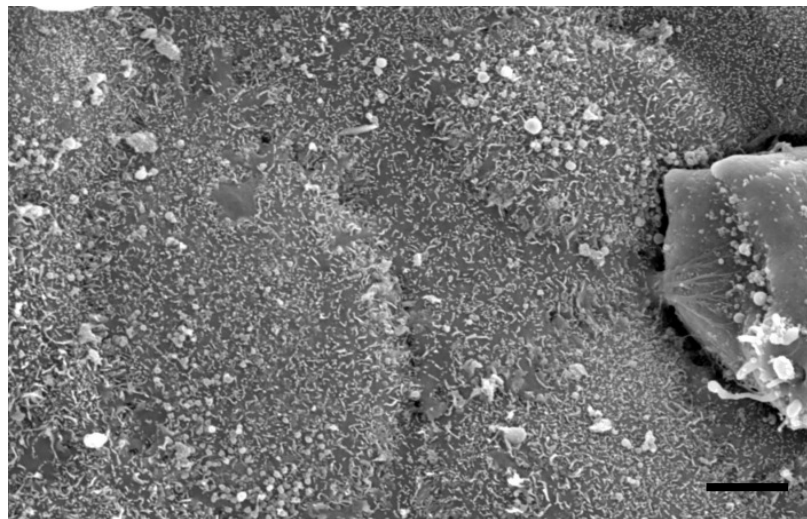
*Abbildung 4.11: REM-Aufnahme der Oberfläche exzidierten Haut; Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$*



*Abbildung 4.12: REM-Aufnahme der Oberfläche des Hautmodells; Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$*



*Abbildung 4.13: REM-Aufnahme des Stratum corneums; Balkenlänge entspricht 5  $\mu$ m*



*Abbildung 4.14: REM-Aufnahme der Oberfläche des Hautmodells; Balkenlänge entspricht 5  $\mu$ m*

Die hier gefundenen Ergebnisse der Oberflächenuntersuchung mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie stehen im Einklang mit der in Abschnitt 4.2. gefundenen Tatsache, dass bei den organotypischen Hautmodellen kein ausgeprägtes Stratum corneum nachgewiesen werden konnte. Es besteht vielmehr eine Ähnlichkeit zu epithelialem Gewebe.

#### **4.3.3. Charakterisierung der humanen Hautmodelle mit Hilfe der DSC und der Röntgenstrukturanalyse**

In der Literatur werden zur Charakterisierung des Stratum corneum sehr häufig thermoanalytische oder röntgenographische Messmethoden beschrieben. Mit Hilfe dieser Methoden wurde versucht auch bei den organotypischen Hautmodellen vorhandene Lipidstrukturen nachweisen zu können.

DSC-Untersuchungen werden zur Beschreibung der Struktur, insbesondere der Lipidanordnung der menschlichen Hornschicht, herangezogen (s. Abschnitt 2.1.5). Im Idealfall können beim Stratum corneum 4 endotherme Übergänge im Bereich um 40 °C (T1), 70 °C (T2), 80 °C (T3) und 105 °C (T3) detektiert werden. Es erschien im Vorfeld fraglich, ob die Lipidmenge in den Hautmodellen für diese Bestimmungsmethode ausreichend ist, da für die Messungen mit Stratum corneum in früheren Arbeiten in unserem Institut Einwaagen an Stratum corneum von ca. 8-12 mg nötig waren [Stoye, 1997; Winkler, 2005]. Da die Herstellung der Hautmodelle sehr kostenintensiv ist, stand für die Untersuchungen leider nicht so viel Material zur Verfügung.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Hautmodelle wie in Abschnitt 3.2.3.6. beschrieben vorbereitet und in ihrer Gesamtheit thermoanalytisch vermessen. Es zeigte sich sowohl bei den Hautmodellen ohne Sebozyten als auch bei den Hautmodellen mit inkorporierten Sebozyten ein endothermer Phasenübergang bei 53 °C (Abbildung 4.15, mittlerer und unterer Graph), der keinem der typischen Übergänge im Stratum corneum zugeordnet werden kann. Vermutlich war die Menge an Lipiden bezogen auf die Gesamtmasse der Hautmodelle zu gering, um mit Hilfe dieser Methode Veränderungen in der Lipidstruktur nachweisen zu können. Die Ursache des detektierten Peaks, sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Aus diesem Grund wurde das Hautmodell in Epidermis- und Dermisäquivalent getrennt, und beide Schichten wurden einzeln untersucht. Die Entfernung der nur sehr dünnen Epidermisschicht vom Dermisäquivalent erwies sich als relativ schwierig, ist aber dennoch gelungen. Es wurden ca. 5 mg an Epidermis eingewogen, wobei zwischen 40 und 105 °C keine Peaks im Thermogramm detektiert werden konnten (Abbildung 4.16), sowohl mit als auch ohne Sebozyten im Epidermisäquivalent. Man kann also davon ausgehen, dass die Lipidmenge in der Epidermis der Hautmodelle zu gering für einen Nachweis mit Hilfe der thermoanalytischen Methode ist, bzw. dass die zur Verfügung stehenden Mengen an Ausgangsmaterial zu gering sind.

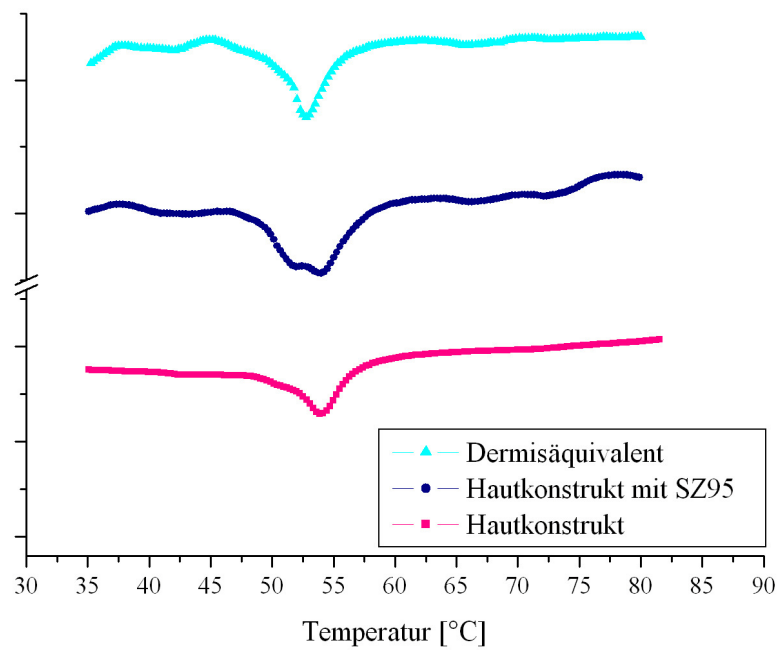


Abbildung 4.15: Thermogramme verschiedener Hautmodelle im Vergleich zum reinen Dermisäquivalent

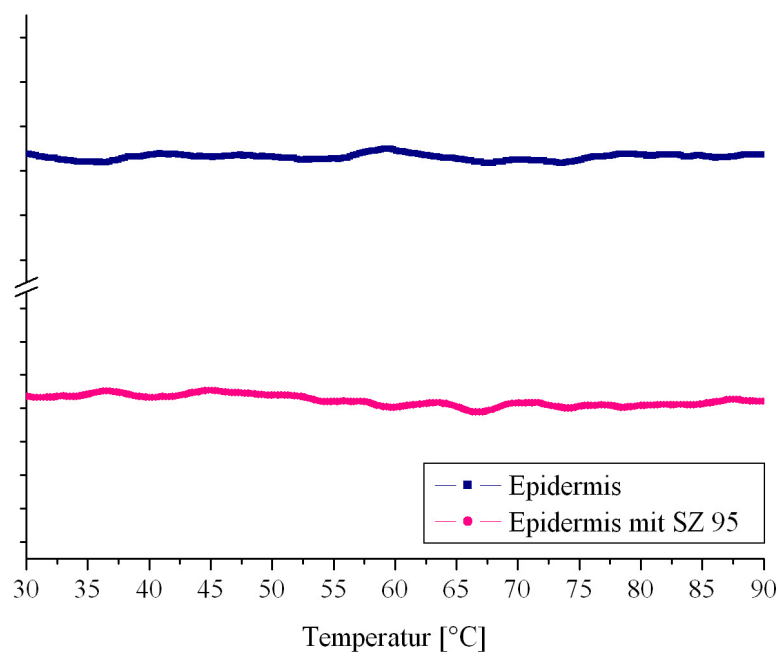


Abbildung 4.16: Thermogramm der Epidermis von Hautmodellen mit und ohne SZ 95



Eine alleinige thermoanalytische Untersuchung der Dermisäquivalente zeigte einen deutlichen endothermen Übergang bei einer Temperatur von ca. 53 °C (Abbildung 4.15, oberer Graph), der auch bei den kompletten Hautmodellen nachgewiesen werden konnte. Da sowohl die Hautmodelle wie auch das Dermisäquivalent zu einem großen Anteil aus Kollagen bestehen, ist es sehr wahrscheinlich, dass der endotherme Phasenübergang bei 53 °C auf Veränderungen in der Kollagenstruktur zurückzuführen ist.

Durch Röntgenweitwinkeluntersuchungen (WAXD) werden Informationen über den Ordnungszustand der Lipide und Proteine des Stratum corneum gewonnen. Wie in Abschnitt 2.1.6. beschrieben, werden im Idealfall zwei scharfe Interferenzen bei Nahordnungsabständen von ca. 0,37 und 0,42 nm und zwei diffuse Halos mit Schwerpunkten bei 0,46 und 0,98 nm registriert [Bouwstra et al., 1992]. Bei Untersuchungen der Hautmodelle und der Epidermisäquivalente der Hautmodelle allein konnten keine Interferenzen und Halos detektiert werden. Auch hier ist die Menge bzw. die Ordnung der Lipide wahrscheinlich nicht ausreichend für eine Detektion.

In Röntgenkleinwinkeluntersuchungen zeigten Bouwstra et al. (1991a; 1992), dass das Stratum corneum zwei unterschiedliche Lamellarphasen enthalten muss, die einen Netzebenenabstand von 6,4 und 13,4 nm haben und nebeneinander vorliegen. Im Jahr 2000 untersuchten Ponec et al. u.a. die Stratum corneum Lipidorganisation von kommerziellen Hautmodellen ebenfalls mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD). Für die untersuchten kommerziellen Hautmodelle Epiderm und Episkin, beides reine Epidermismodelle, ist es gelungen mit Hilfe der Synchrotronstrahlung eine Lamellarphase mit einem Netzebenenabstand von 12,3 nm für das Stratum corneum von Epiderm nachzuweisen. Ein weiterer Netzebenenabstand von 3,4 nm durch die Anwesenheit von kristallinem Cholesterol ist auch im Episkin Modell nachzuweisen. Allerdings ist beim Episkin der Reflex für die Lamellarphase nur schwach ausgeprägt, so dass hier eine sehr viel geringere Lipidorganisation im Stratum corneum vorhanden ist.

Bei der Untersuchung unserer Hautmodelle, insbesondere der Epidermisäquivalente zeigten sich keine detektierbaren Reflexe bei den SAXD Messungen, was auf einen zu geringen Anteil an geordnetem Material schließen lässt. Allerdings wurde für die an unseren Hautmodellen durchgeführten Messungen keine Synchrotronstrahlung wie bei Ponec et al. (2000) verwendet. Aufgrund der niedrigeren Intensität sind die generell schwach ausgeprägten Reflexe bei der vorliegenden Messmethode wahrscheinlich nicht nachweisbar.

#### **4.3.4. Lipidnachweis in den humanen Hautmodellen**

Zur weiteren Charakterisierung der Hautmodelle mit und ohne Sebozyten und zum Vergleich der Hautmodelle, zum einen mit den In-vivo-Verhältnissen und zum anderen mit kommerziellen Hautmodellen, wurden die Hautmodelle gefriergetrocknet und wie in Abschnitt 3.2.3.3. beschrieben an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken auf ihren Gesamtlipidgehalt und auf einzelne Lipidfraktionen (Cholesterol, Cholesterolester freie Fettsäuren, Triglyceride und Ceramide III & IV) mit Hilfe der HPTLC untersucht. Es wurden die Menge an Lipiden der Hautmodelle mit und ohne Sebozyten in der Dermis und Epidermis bestimmt, sowie auch der Einfluss des Kollagens, der für die Kultivierung verwendeten Nährmedien und der zum Aufbau der Hautmodelle verwendeten Zellarten.

Da zu erwarten war, dass die Menge an Lipiden in den Hautmodellen äußerst gering ist, wurden immer 4 Hautmodelle gemeinsam gefriergetrocknet, um die Lipide in ausreichender Menge nachweisen zu können. Insgesamt erfolgte pro Versuchsreihe eine Dreifachbestimmung.

In den zwei Versuchsreihen, die im August 2004 und im Januar 2005 durchgeführt wurden, sind deutliche Unterschiede aufgetreten. In Tabelle 4.1 sind die Mengen der extrahierten Lipide bezogen auf das Trockengewicht dargestellt, während Tabelle 4.2 einen Überblick über die Mengen der einzelnen nachgewiesenen Lipidfraktionen gibt.

Untersucht wurden nicht nur die Hautmodelle mit und ohne Sebozyten, sondern auch das in hoher Konzentration für die Herstellung eingesetzte Rohkollagen und die reine Kollagenmatrix. Die Kollagenmatrix wurde genauso wie die Hautmodelle (in den Tabellen als ASC- für artificial skin constructs- abgekürzt) hergestellt und über 4 Wochen in den entsprechenden Medien kultiviert, enthielt allerdings weder Fibroblasten im Kollagengel noch aufgesäte Keratinozyten, so dass es auch nicht zu einer Kontraktion des Kollagengels gekommen ist.

Es ist auffällig, dass die Mengen an extrahierten Lipiden (Tabelle 4.1) in den beiden Versuchsreihen deutlich differieren. In der 2. Versuchsreihe vom Januar 2005 wurden insgesamt mehr Lipide nachgewiesen, z.T. bis zu 3-mal soviel wie im August 2004. Bei beiden Versuchsreihen konnten allerdings bei den Hautmodellen im Vergleich zum Rohkollagen und der Kollagenmatrix mehr Lipide nachgewiesen werden, so dass von einer Neubildung der Lipide durch die im Kollagengel inkorporierten Fibroblasten und die aufgesäten Keratinozyten ausgegangen werden kann. Eine weitere Erhöhung der Lipidmenge durch die Inkorporation der lipidproduzierenden Sebozytenzelllinie in das Dermis- oder

Epidermisäquivalent ist allerdings nicht zu erkennen. Es ist sogar verwunderlich, dass im August 2004 deutlich weniger Lipide bei den Hautmodellen mit Sebozyten im Epidermisäquivalent nachgewiesen werden konnten. Durch Mehrfachextraktion wurde allerdings sichergestellt, dass keine weiteren Lipide mehr zu extrahieren waren.

Dieses Ergebnis ist wichtig für weitere Erklärungsansätze und den Vergleich mit kommerziellen Hautmodellen sowie der menschlichen Haut.

*Tabelle 4.1: Extrahierte Gesamtlipidmenge bezogen auf das Trockengewicht (in % m/m)*

	<b>Roh- kollagen</b>	<b>Kollagen- matrix</b>	<b>ASC</b>	<b>ASC (SZ Dermis)</b>	<b>ASC (SZ Epidermis)</b>
1. Versuchsreihe August 2004	$3,63 \pm 2,11$	$3,57 \pm 1,11$	$8,28 \pm 2,55$	$8,21 \pm 0,60$	$4,89 \pm 0,64$
2. Versuchsreihe Januar 2005	$4,79 \pm 0,92$	$10,99 \pm 0,12$	$14,02 \pm 0,43$	$13,4 \pm 0,39$	$14,69 \pm 1,17$

*Tabelle 4.2: Zusammenstellung der erfassten Lipide (in % m/m bezogen auf die extrahierte Gesamtlipidmenge) der beiden Versuchsreihen im August 2004 (1. Wert) und Januar 2005 (2. Wert)*

	<b>Roh- kollagen</b>	<b>Kollagen- matrix</b>	<b>ASC</b>	<b>ASC (SZ Dermis)</b>	<b>ASC (SZ Epidermis)</b>
Cholesterol	$8,67 \pm 4,96$	$28,03 \pm 6,06$	$31,68 \pm 13,06$	$58,39 \pm 5,88$	$30,61 \pm 3,14$
	$13,78 \pm 4,54$	$41,28 \pm 5,31$	$63,55 \pm 3,18$	$51,57 \pm 1,96$	$61,63 \pm 2,10$
Cholesterol- ester	----	$35,40 \pm 4,06$	$14,98 \pm 4,05$	$9,07 \pm 1,72$	$41,20 \pm 8,09$
	----	$23,77 \pm 4,04$	$3,23 \pm 0,16$	$4,71 \pm 0,71$	$3,20 \pm 0,02$
Freie Fettsäuren	$35,76 \pm 4,46$	----	$9,75 \pm 1,56$	$6,96 \pm 1,63$	----
	$32,74 \pm 1,90$	----	----	----	----
Triglyceride	$48,19 \pm 0,59$	$36,56 \pm 2,66$	$31,19 \pm 12,39$	$18,53 \pm 3,82$	$24,94 \pm 2,28$
	$47,41 \pm 6,80$	$34,95 \pm 1,27$	$31,01 \pm 2,69$	$40,41 \pm 1,50$	$39,94 \pm 2,09$
Ceramide	$7,39 \pm 0,22$	----	$12,4 \pm 4,67$	$7,04 \pm 0,27$	$3,243 \pm 5,62$
(gesamt)	$6,07 \pm 0,80$	----	$2,21 \pm 0,40$	$3,31 \pm 1,57$	$2,23 \pm 0,07$

In Tabelle 4.2 sind die nachgewiesenen Lipide in % (m/m) bezogen auf die Gesamtlipidmenge angegeben. Alle Proben wurden auch auf ihren Squalengehalt untersucht, da Squalen das für die Talgdrüsen typische Lipid ist und vermutet wurde, dass durch die Inkorporation der Sebozyten in das Hautmodell der Gehalt an Squalen ansteigt. In allen Proben konnte allerdings kein Squalen mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Vergleicht man die im Rohkollagen und der Kollagenmatrix enthaltenen Lipide und deren Menge, so fällt auf, dass die Menge an Cholesterol in der Kollagenmatrix ansteigt und dass Cholesterolester nur bei der Kollagenmatrix enthalten ist. Bei beiden Substanzen scheint sich also durch das Kultivierungsmedium die Menge der Lipide zu erhöhen bzw. sind sie überhaupt vorhanden. Demgegenüber sind freie Fettsäuren und Ceramide nur im Rohkollagen enthalten, scheinen also durch die Verdünnung des Rohkollagens zu verschwinden, während die Menge an Triglyceriden in der Kollagenmatrix im Gegensatz zum Rohkollagen leicht reduziert ist.

Im Vergleich der Kollagenmatrix mit den eigentlichen Hautmodellen (ASC), die sich ja durch die Anwesenheit der inkorporierten Fibroblasten und aufgesäten HaCaT-Zellen unterscheiden, fällt auf, dass die Menge an Cholesterol leicht angestiegen ist, und es auch zu einer Neubildung von Ceramiden gekommen ist. Warum die freien Fettsäuren, die im Rohkollagen in erheblichem Maße vorhanden sind, in der Kollagenmatrix gar nicht und im Hautmodell nur in einer Versuchsreihe in geringem Maße auftreten, ist unklar. Aber Abbildung 4.17 zeigt sehr deutlich, warum der Gehalt an Cholesterol sowohl in der Kollagenmatrix wie auch im Hautmodell gegenüber dem Rohkollagen erhöht ist. In dieser Abbildung sind die eingesetzten Medien und die 3 verschiedenen Zelllinien auf ihren Lipidgehalt untersucht worden, wobei in allen Proben nur Cholesterol und Cholesterolester nachgewiesen werden konnten. Dadurch, dass für diese Untersuchungen zum besseren Vergleich alle 3 Zelllinien im Medium I kultiviert wurden, zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den Mengen an Cholesterolestern und Cholesterol zwischen den einzelnen Zelllinien und dem Medium I. Auffällig ist allerdings, dass die Menge an Cholesterol bei den HaCaT-Zellen deutlich erhöht ist. Die Zellen scheinen also Cholesterol an das Medium abzugeben, weshalb auch der Gehalt an Cholesterol bei den Hautmodellen gegenüber der Kollagenmatrix erhöht ist.

Durch die Inkorporation der Sebozytenzelllinie SZ 95, insbesondere im Epidermisäquivalent, war ein Anstieg der Lipidmenge zu erwarten, die sich in späteren Permeationsuntersuchungen (s. Abschnitt 4.4.1.4.) auch positiv auf die Permeationsbarriere der Hautmodell auswirken könnte.

In der Zusammensetzung der Lipide sind allerdings bei den beiden Versuchsreihen große Abweichungen zu erkennen, so dass eine Schlussfolgerung schwierig ist. Die Menge an Cholestereestern schwankt sehr stark und nur in der Versuchsreihe vom August 2004 waren bei den Hautmodellen mit und ohne Sebozyten in der Dermis freie Fettsäuren nachweisbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die Werte im Bereich der Nachweisgrenze befanden.

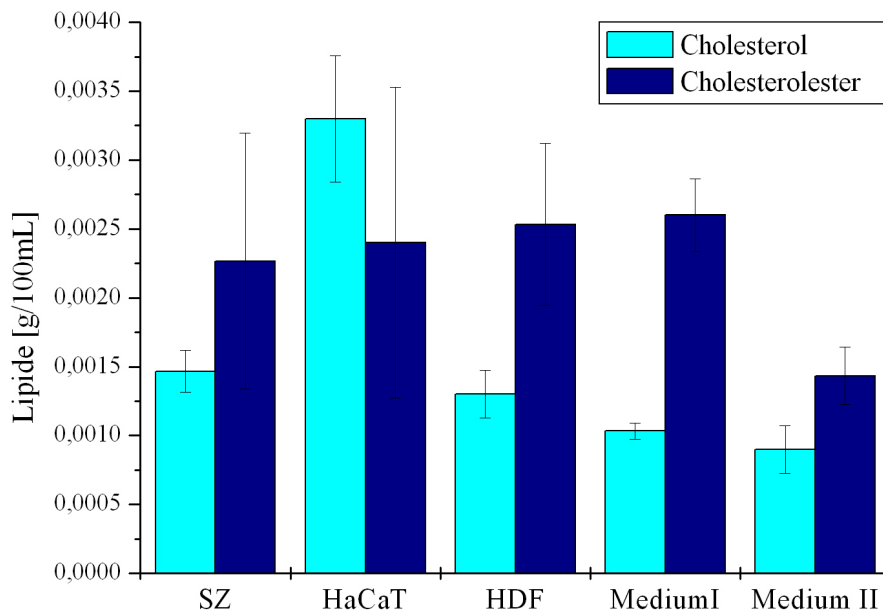


Abbildung 4.17: Menge an Cholesterol und Cholesterolestern in den Medien und den einzelnen Zelllinien kultiviert als Monolayer im Medium I

Abschließend wurden die Hautmodelle noch in Dermis- und Epidermisäquivalent getrennt, um die Hautlipide genauer lokalisieren zu können. Die extrahierte Lipidmenge betrug bei den Epidermisäquivalenten 20,8 % und bei den Dermisäquivalenten 11,2 % des Trockengewichts. Dies Ergebnis zeigt deutlich, dass sich die Hauptmenge der Lipide der Hautmodelle in der Epidermis befindet. Dies steht in Einklang mit den Verhältnissen in vivo, wo sich die Lipide hauptsächlich im Stratum corneum der Epidermis befinden. Bei dieser Versuchsreihe waren nur im Epidermisäquivalent Spuren von freien Fettsäuren nachweisbar. Abbildung 4.18 zeigt, dass der Gehalt an Cholesterol in der Epidermis leicht erhöht und der Gehalt an Cholesterolestern dort leicht erniedrigt ist. Unterschiede im Gehalt der Triglyceride und Ceramide bestehen nicht zwischen Dermis- und Epidermisäquivalent.

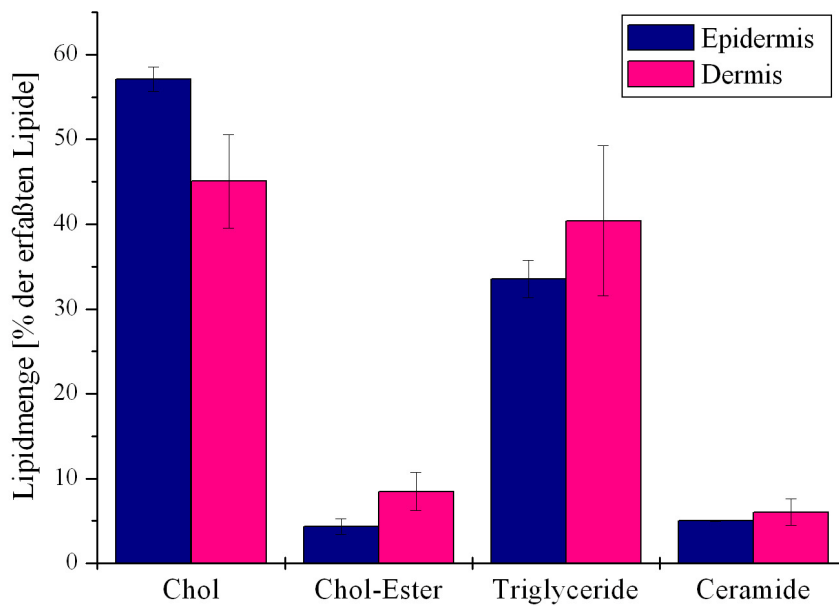


Abbildung 4.18: Menge an unterschiedlichen Lipidfraktionen in Epidermis- und Dermisäquivalent der Hautmodelle (Chol = Cholesterol, Chol-Ester = Cholesterolester)

#### 4.3.5. Rheologische Untersuchung der Hautmodelle in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer

Um zum einen die Veränderungen im Hautmodell über die Dauer der Kultivierung und zum anderen die Einflüsse der inkorporierten Sebozytenzelllinie SZ 95 sowie eines kommerziellen Kollagens auf die Beschaffenheit der Hautmodelle zu erfassen, wurden die Hautmodelle über die Dauer der Kultivierung in Abständen von 7 Tagen rheologisch untersucht.

Bei den Hautmodellen (s. Abschnitt 3.2.2.) handelt es sich um Kollagengele, die sich während ihrer 4-wöchigen Kultivierungsphase durch die Inkorporation und Aufsaat von Zellen kontinuierlich verändern. Einerseits kommt es durch die inkorporierten Fibroblasten zur Kontraktion der Kollagengele und andererseits durch die aufgesäten HaCaT-Zellen zur Ausbildung einer widerstandsfähigen Epidermis. Dies sind beides Faktoren, die der Schubspannung, die während der rheologischen Messungen auf das Hautmodell gegeben wird, entgegenwirken. Während der Messung (s. Abschnitt 3.2.3.5.) wurde das Hautmodell zwischen 2 Platten oszillationsrheologisch vermessen, wobei der Abstand der Platten für jedes einzelne Hautmodell auf 2/3 der ursprünglichen Dicke eingestellt wurde, damit eine

Kraftübertragung von einer Platte auf die andere möglich war. Die Dicke der Hautmodelle betrug bei der ersten Messung 7 Tage nach der Herstellung über  $2000\text{ }\mu\text{m}$  und nahm bis zur letzten Messung nach 28 Tagen auf bis zu  $300\text{ }\mu\text{m}$  ab. Dies allein ist schon ein deutlicher Hinweis auf die Veränderungen im Hautmodell während der Kultivierung, insbesondere auf die Kontraktion des Kollagengels. Die Dicken der Hautmodelle variierten von Charge zu Charge geringfügig, allerdings war die Dicke der fertigen Konstrukte, 4 Wochen nach der Herstellung, sehr konstant bei  $300 - 400\text{ }\mu\text{m}$ .

Die Oszillationsmessungen wurden im vorab ermittelten linearviskoelastischen Bereich durchgeführt. Dabei bleibt die Mikrostruktur der Probe während der Messung erhalten, und die oszillationsrheologischen Kenngrößen wie Speichermodul, Verlustmodul und Phasenwinkel bleiben konstant. Nach Aufgabe einer sinusförmigen Schubspannung  $\tau$  [Pa] mit konstanter Frequenz auf die Probe, macht sich das Relaxationsverhalten eines viskoelastischen Stoffes in einer Phasenverschiebung  $\delta$  zwischen angelegter Schubspannung und daraus resultierender Deformation bemerkbar. Während für rein elastische Festkörper  $\delta = 0^\circ$  und für viskose Flüssigkeiten  $\delta = 90^\circ$  ist, gilt für viskoelastische Stoffe  $0^\circ < \delta < 90^\circ$ .

Aus der sinusförmigen Ergebniskurve wurden folgende Größen ermittelt und für die Auswertung herangezogen:

- Speichermodul  $G'$  [Pa]: Sein Wert stellt ein Maß für die Größe der reversibel in der Substanz gespeicherten und zurückgewinnbaren Deformationsenergie dar. Er charakterisiert das elastische Verhalten einer Probe.
- Verlustmodul  $G''$  [Pa] : Sein Wert stellt ein Maß für die Größe der irreversibel von der Substanz an die Umgebung abgegebene und damit verlorene Energie dar. Er charakterisiert das viskose Verhalten einer Probe.
- Verlustfaktor  $\tan \delta = G''/G'$ : Er gibt das Verhältnis zwischen dem viskosen und dem elastischen Anteil einer Messprobe an. Aus dem Verlustfaktor lässt sich der Phasenwinkel  $\delta$  bestimmen. Je höher der Wert für  $\tan \delta$ , desto größer ist auch der Wert für  $\delta$ , d.h. um so mehr nähert sich das System einer ideal-newtonschen Flüssigkeit an.

In Abschnitt 2.2.1. ist die Haut als viskoelastisches System ausführlich beschrieben, deren biomechanische Eigenschaften in erster Linie von der Dermis abhängen. Die Dermis besteht zum einen aus der Matrix, die ein viskoses Material darstellt und durch Veränderungen in der Zusammensetzung die viskoelastischen Eigenschaften der Haut verändert, und zum anderen aus Fasern, die parallel zu einander verlaufen, elastische und viskose Eigenschaften sowie hohe Reiß- und Zugfestigkeit besitzen. Die Epidermis ist durch die Anwesenheit faserartiger Keratine sowohl widerstandsfähig als auch zäh und elastisch federnd. Die biomechanische Funktion der Epidermis wird hauptsächlich durch das Stratum corneum bedingt [Gütt, 1998].

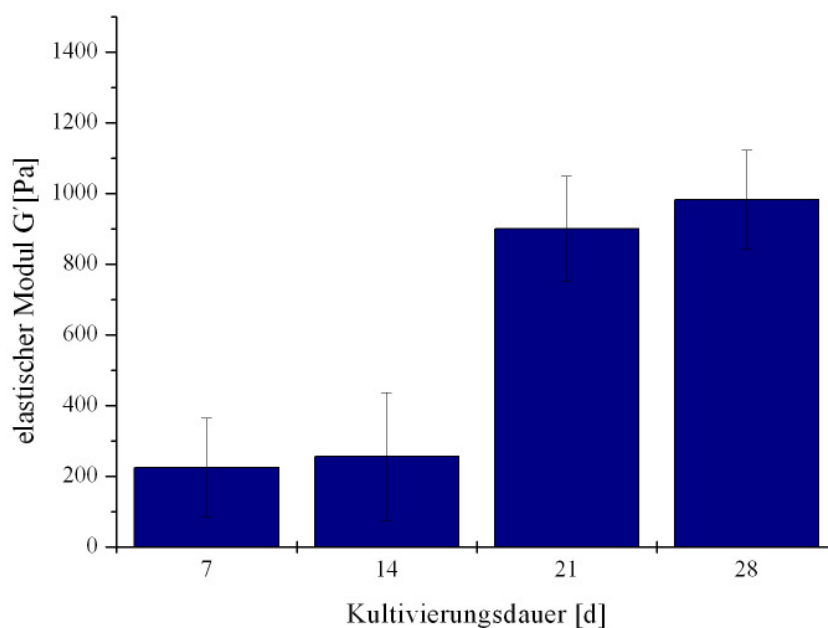


Abbildung 4.19: Veränderung des elastischen Moduls  $G'$  der Hautmodelle während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

In den Abbildungen 4.19-4.21 sind die Veränderungen der oszillationsrheologischen Kenngrößen der Hautmodelle über die Kultivierungsdauer von 28 Tagen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich nach 14 Tagen, der Hälfte der Kultivierungszeit, der elastische Modul und der viskose Modul sprunghaft ändern, und zwar in dem Maße, dass beide Module deutlich zunehmen. Die Zunahme ist allerdings unterschiedlich ausgeprägt, der elastische Modul nimmt nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen um den Faktor 4 und der viskose Modul um den Faktor 2 zu.



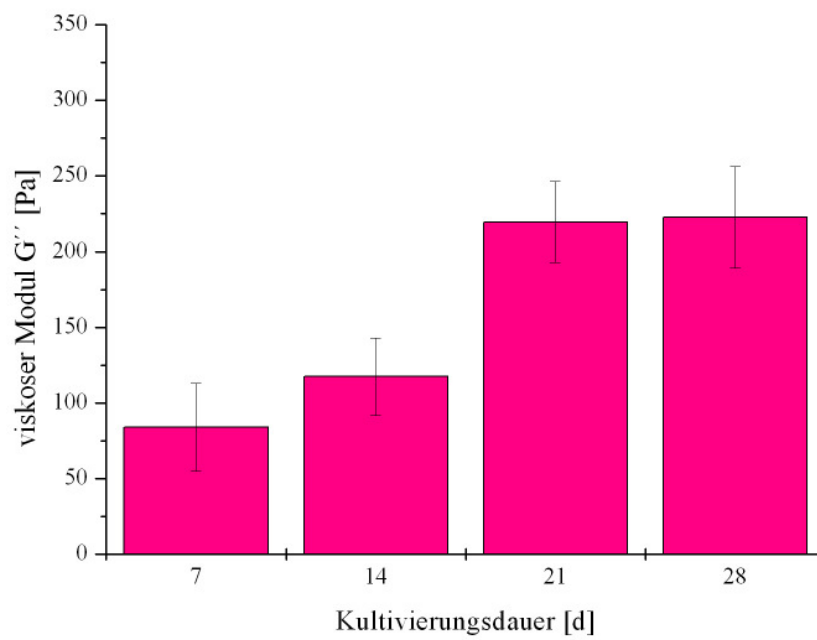


Abbildung 4.20: Veränderung des viskosen Moduls  $G''$  der Hautmodelle während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

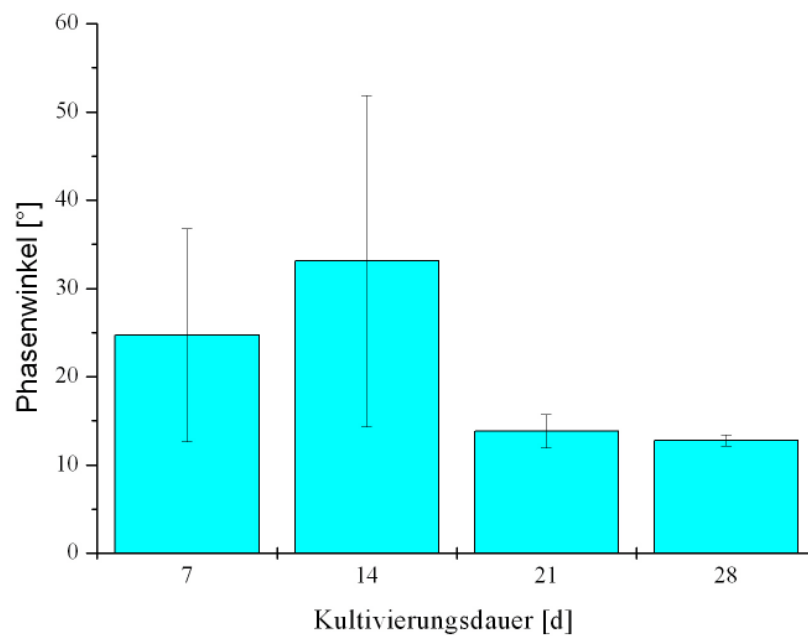


Abbildung 4.21: Veränderung des Phasenwinkels  $\delta$  der Hautmodelle während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

Schon zu Beginn der Untersuchungen liegt der elastische Modul mit etwa 200 Pa deutlich über dem viskosen Modul mit etwa 100 Pa. Es überwiegen im Hautmodell also grundsätzlich die elastischen Eigenschaften, die über die Zeit der Kultivierung noch weiter ansteigen. Die Kontraktion des Kollagengels lässt sich also nicht nur makroskopisch erkennen, sondern auch durch oszillationsrheologische Messungen verdeutlichen, indem man die Veränderung des viskosen und elastischen Moduls betrachtet. Beide Größen fließen in den Phasenwinkel  $\delta$  ein. Je größer der Wert für  $\delta$  ist, um so mehr nähert sich das System einer ideal-newtonschen Flüssigkeit an. Im vorliegenden Fall nimmt der Phasenwinkel sprunghaft von 14 zu 21 Tagen der Kultivierung ab, so dass das System sich bei fortschreitender Kultivierung mehr einem Festkörper annähert. Außerdem ist die Standardabweichung nach 3 Wochen Kultivierungszeit deutlich reduziert, so dass auch dies ein Hinweis auf die abgeschlossene Gelbildung ist.

Insgesamt lässt sich für die Hautmodelle festhalten, dass der Aufbau der Gelstruktur erst nach 21 Tagen der Kultivierung vollständig abgeschlossen erscheint, und dass ab diesem Zeitpunkt keine weiteren mit dieser Methode messbaren strukturellen Veränderungen im Hautmodell auftreten. Die deutliche Reduktion der prozentualen Standardabweichung nach der Kultivierung von 21 Tagen ist ein weiterer wichtiger Hinweis auf die abgeschlossene Kontraktion des Kollagengelgerüsts. Auffällig ist allerdings, dass die Ausbildung der Epidermis, die ja nach 21 Tagen Kultivierung noch nicht vollständig abgeschlossen ist (s. Abschnitt 4.2.1.), keinen Einfluss mehr auf das rheologische Verhalten der Hautmodelle hat.

Durch die Inkorporation der Sebozytenzelllinie SZ 95 in das Dermisäquivalent wurde erwartet, dass Veränderungen in der Gerüststruktur des Kollagengels auftreten, da die Sebozyten durch ihre Anwesenheit die Kontraktion des Kollagengels, verursacht durch die lebenden Fibroblasten, beeinflussen könnten. Vergleicht man die Abbildungen 4.22–4.24 mit den vorherigen Abbildungen, wird allerdings deutlich, dass kein Unterschied zwischen den Hautmodellen mit und ohne Sebozyten besteht. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Anstieg für den elastischen und den viskosen Modul nach einer Kultivierungszeit von 21 Tagen, und zwar in gleichem Maße wie ohne inkorporierte Sebozyten.

Auffallend ist hier der Phasenwinkel, der zwischen den ersten beiden Messpunkten leicht ansteigt, insgesamt betrachtet aber relativ konstant ist und insbesondere nach 21 Tagen der Kultivierung eine deutlich reduzierte Standardabweichung aufweist.

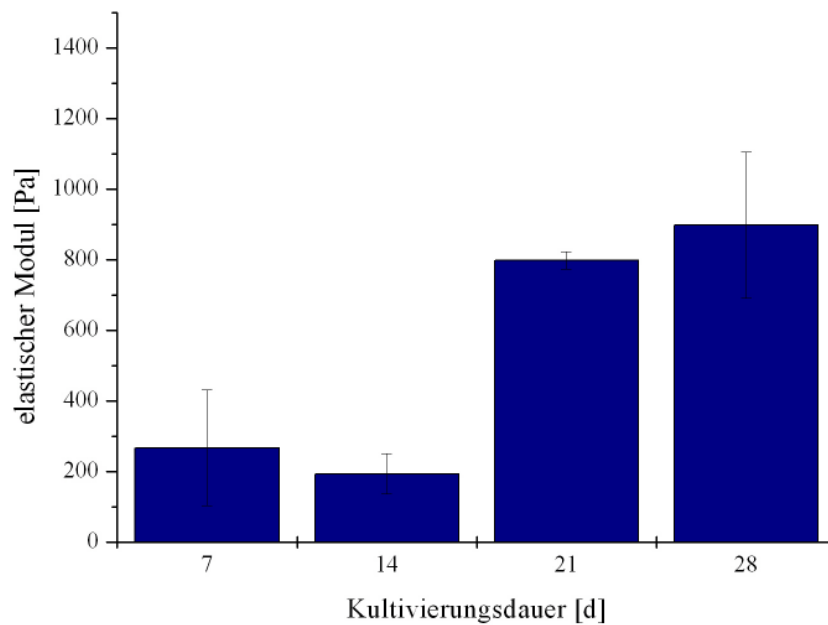


Abbildung 4.22: Veränderung des elastischen Moduls  $G'$  der Hautmodelle mit inkorporierten Sebozyten im Dermisäquivalent während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

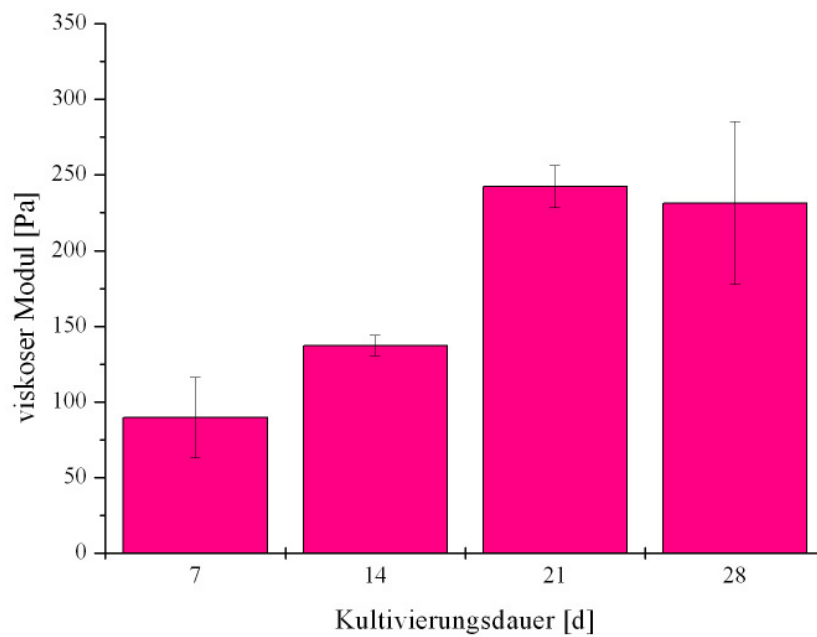


Abbildung 4.23: Veränderung des viskosen Moduls  $G''$  der Hautmodelle mit inkorporierten Sebozyten im Dermisäquivalent während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

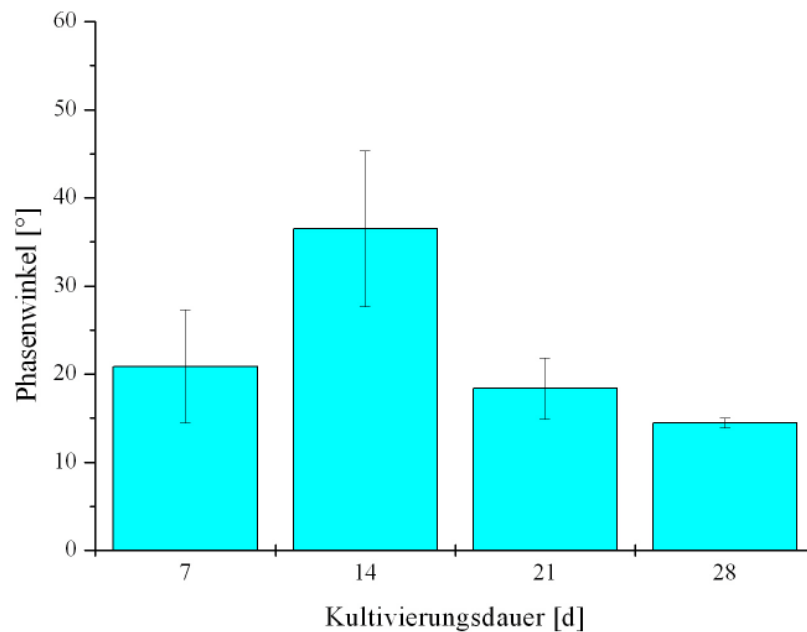


Abbildung 4.24: Veränderung des Phasenwinkels  $\delta$  der Hautmodelle mit inkorporierten Sebozyten im Dermisäquivalent während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

Bei der Verwendung eines kommerziellen Kollagens zur Herstellung der Hautmodelle ergibt sich bei den oszillationsrheologischen Untersuchungen ein etwas anderes Ergebnis (Abbildungen 4.25–4.27). Die elastischen und viskosen Module sind zwar bei den ersten beiden Messpunkten nach 7 und 14 Tagen vergleichbar mit denen der aus Rattenschwanzkollagen hergestellten Hautmodelle, allerdings kommt es dann nicht zu einer sprunghaften Änderung der Module. Beide Module steigen zwar an, aber nach 21 Tagen erst um den Faktor 2 und dann bis zum Tag 28 nach der Herstellung wiederum um den Faktor 2. Dadurch, dass das Verhältnis von elastischem zu viskosem Modul nahezu konstant bleibt, ändert sich auch der Phasenwinkel  $\delta$  nicht über die Kultivierungszeit und liegt mit etwa  $15^\circ$ , vergleichbar zum Phasenwinkel der anderen Hautmodelle nach einer Kultivierungszeit von 21 Tagen. Der Strukturaufbau bei den Hautmodellen aus kommerziellem Kollagen erscheint langsamer und nicht vor einer Kultivierungszeit von 28 Tagen abgeschlossen zu sein. Allerdings überwiegen auch hier die elastischen Anteile während der gesamten Kultivierungszeit.

Insgesamt lässt sich mit Hilfe der rheologischen Untersuchungen die Strukturveränderung (Kontraktion des Kollagens) der Hautmodelle über die Dauer der Kultivierung sehr deutlich beschreiben.

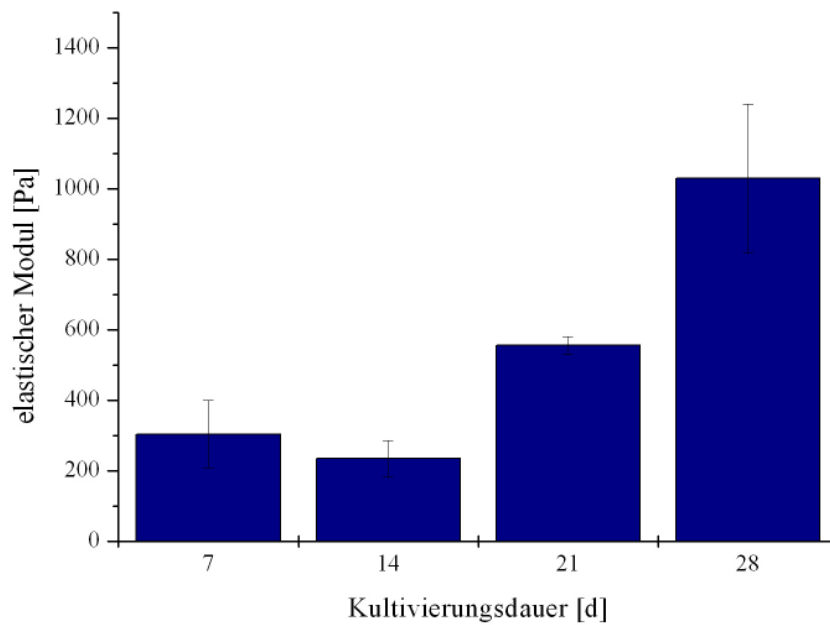


Abbildung 4.25: Veränderung des elastischen Moduls  $G'$  der Hautmodelle- hergestellt mit Hilfe eines kommerziellen Kollagens- während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

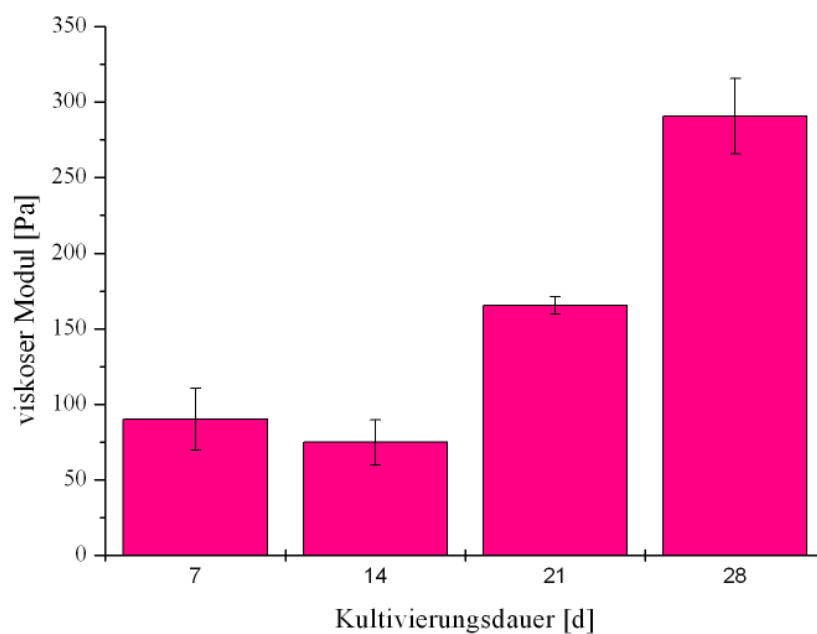


Abbildung 4.26: Veränderung des viskosen Moduls  $G''$  der Hautmodelle- hergestellt mit Hilfe eines kommerziellen Kollagens- während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

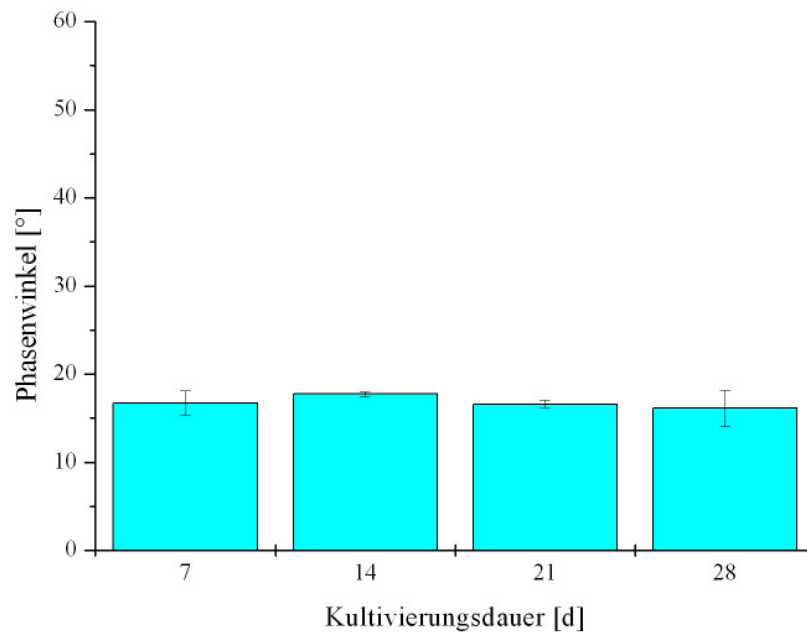


Abbildung 4.27: Veränderung des Phasenwinkels  $\delta$  der Hautmodelle- hergestellt mit Hilfe eines kommerziellen Kollagens- während der Kultivierungszeit von 28 Tagen

#### 4.3.6. Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der humanen Hautmodelle

Die immunhistologische Untersuchung des organotypischen Hautmodells zeigt, dass die Basalmembrankomponente Laminin zwischen Dermis und Epidermis vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen die Zellen in der Lage sind, basalmembranähnliche Strukturen auszubilden, die das Adhäsionsprotein Laminin enthalten. Das angebotene Substrat, ein Kollagengel aus überwiegend Kollagen Typ I, ist also zur Kultivierung geeignet. Bei anderen kommerziellen Epidermismodellen (z.B. Skinethic und Epiderm) konnte nach Herstellerangaben dieses Protein ebenfalls nachgewiesen werden.

In den Untersuchungen zur Oberflächenstruktur ergaben sich wenig Ähnlichkeiten zwischen dem organotypischen Hautmodell und der exzidierten Haut bzw. dem exzidierten Stratum corneum. Im Rasterelektronenmikroskop waren beim Hautmodell dichte Strukturen mit Mikrovilli zu erkennen, die eher mit einem Epithelgewebe vergleichbar sind. Eine Abflachung der Zellen und ein nur lockerer Zusammenhalt, wie es beim Stratum corneum zu finden ist, sind bei den Hautmodellen nicht nachweisbar gewesen.

Mit Hilfe thermoanalytischer und röntgenographischer Methoden waren keine für das Stratum corneum typischen Lipidstrukturen in den organotypischen Hautmodellen zu erkennen. Dies kann mehrere Ursachen haben, zum einen können in den Hautmodellen zu wenig Lipide enthalten sein, bzw. die Menge an Lipiden, die untersucht wurde, war zu gering, zum anderen kann es aber auch daran liegen, dass insbesondere bei den Röntgenkleinwinkeluntersuchungen die verwendete Strahlung unseres Messgerätes nicht ausreichend war. Außerdem wurde bei unseren Untersuchungen immer die komplette Epidermis untersucht und nicht wie bei Ponec et al. (2000) nur das isolierte Stratum corneum der rekonstruierten Epidermismodelle, da eine Isolierung des Stratum corneums von unseren Hautmodellen nicht möglich war.

Dass doch typische Stratum corneum Lipide in den organotypischen Hautmodellen vorhanden sind, konnte mittels HPTLC gezeigt werden. So waren u.a. Cholesterol, Cholesterolester, Triglyceride und auch geringe Mengen an Ceramiden in den organotypischen Hautmodellen nachweisbar. Der Vergleich mit In-vivo-Verhältnissen und anderen Untersuchungen ist allerdings erschwert, da in der Literatur meist eine sehr viel größere Anzahl an Lipiden der Epidermis untersucht wurde [Ponec et al., 2000], und sich die Angaben bei uns auf die kompletten Konstrukte, also auf Dermis- und Epidermisäquivalent beziehen. So sind z.B. bei unseren Untersuchungen die Phospholipide, die zu etwa 44,5 % im Stratum basale vorhanden sind, unberücksichtigt geblieben.

Allerdings konnte nach Abtrennung der Epidermis vom Dermisäquivalent in der Epidermis eine doppelt so hohe Menge an Lipiden wie in der Dermis extrahiert werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den In-vivo-Verhältnissen. Zwar waren Spuren von freien Fettsäuren im Epidermisäquivalent nachweisbar, doch war die Menge genauso wie bei den Ceramiden deutlich geringer als in nativer Epidermis [Ponec et al., 2000]

Des weiteren zeigen die beiden Versuchsreihen, dass eine Reproduktion der Messergebnisse schwierig erscheint, und eine allgemein gültige Aussage zur Veränderung der Lipidzusammensetzung durch die Inkorporation der Sebozytenzelllinie SZ 95 nicht möglich ist.

An Hand von oszillationsrheologischen Untersuchungen ist die Kontraktion der Kollagengele messbar. Es war insbesondere durch den deutlichen Anstieg des elastischen Moduls zu erkennen, dass die Kontraktion nach 3 Wochen Kultivierung abgeschlossen ist. Die Ausbildung der Epidermis, die in großem Maße in den letzten 2 Wochen der Kultivierung erfolgt, hat keinen Einfluss mehr auf die oszillationsrheologischen Kenngrößen. Auch die Inkorporation einer weiteren Zelllinie in das Kollagengel ließ keinen Unterschied erkennen.

#### **4.4. Permeationsuntersuchungen**

Das Hauptziel dieser Arbeit war es das von Specht (1998) entwickelte humane Hautmodell, aufgebaut aus humanen dermalen Fibroblasten in einem Kollagengel und einem Epidermisäquivalent aus immortalisierten HaCaT-Zellen, weiter zu entwickeln, um die Permeationsbarriere zu erhöhen und diese der menschlichen Haut weiter anzunähern.

Im Allgemeinen können In-vitro-Untersuchungen zum Penetrations- und Permeationsverhalten von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen sowohl mit tierischen und menschlichen Hautpenden als auch mit einem organotypischen Hautmodell durchgeführt werden. Geschlecht und Alter des Spenders sowie die Körperregion, aus der die Spende entnommen wurde, haben zumeist deutlichen Einfluss auf die Barriereeigenschaft der Haut und somit auf die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse. Durch standardisierte Kultivierung der Hautmodelle mit homogenem Zellmaterial können diese Schwierigkeiten bei In-vitro-Tests vermieden werden.

Um die Vergleichbarkeit organotypischer Hautmodelle für den Einsatz in Permeationsstudien zu testen, ist es sinnvoll, die Permeation verschiedener Arzneistoffe zu bestimmen und mit der Permeation durch exzidiertes Stratum corneum oder exzidierte Vollhaut zu vergleichen. Auch ein Vergleich der Permeation eines Arzneistoffs aus verschiedenen Grundlagen ist für vergleichende Untersuchungen notwendig.

Organotypische Hautmodelle sind in verschiedenen Permeationsuntersuchungen im Vergleich zu humaner Epidermis, humaner Haut, Schweinehaut oder auch Rattenhaut untersucht worden und zeigten in allen Untersuchungen eine höhere Permeabilität [Schmook et al., 2001; Suhonen et al., 2003; Schreiber et al., 2005; Schäfer-Korting et al., 2006]. Als Ursache für die höhere Permeabilität wird in der Literatur zum einen die unvollständig ausgeprägte Barriere beschrieben. Die Ursache hierfür wird u.a. in der geringeren Konzentrationen an freien Fettsäuren und hydrophilen Ceramiden gesehen. Zum anderen wird eine Hyperproliferation der Epidermiszellen aufgrund der Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren als Grund angesehen [Ponec et al., 2002].

Im Rahmen eines BMBF-Projektes wurde in der Prävalidierungsstudie die Vergleichbarkeit der Permeation von Koffein und Testosteron in einer wässrigen Zubereitung durch die 3 kommerziell erhältliche Hautmodelle Skinethic, Episkin und Epiderm sowie durch Schweine-, Menschen- und Kuheuterhaut untersucht. In dieser Prävalidierungsstudie zeigte sich, dass die Reihenfolge der Permeationskoeffizienten abhängig von der Substanz ist, dass die Wirkstoffe durch die Hautmodelle schneller permeieren als durch menschliche Epidermis,



und dass es deutliche Unterschiede zwischen den kommerziellen Hautmodellen gibt [Schäfer-Korting et al., 2006].

Die Hornschicht stellt die eigentliche Barrierschicht der Epidermis dar und ist insbesondere für hydrophile Substanzen wenig durchlässig. Wagner et al. (2001) konnten für verschiedene Arzneistoffe zeigen, dass die Permeation durch humanes Stratum corneum und hitzeseparierte Epidermis vergleichbare Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen der Permeation von Arzneistoffen durch humane Hautmodelle mit der Permeation durch exzidiertes humanes Stratum corneum verglichen.

#### **4.4.1. Permeationsuntersuchungen ibuprofenthaltiger Formulierungen durch humane Hautmodelle**

In Anlehnung an früher durchgeführte Permeationsuntersuchungen diente als Standardsubstanz im weiteren Ibuprofensäure als wirksamer Bestandteil der Ibutop Creme. Bei dem Fertigarzneimittel handelt es sich um eine O/W-Cremeformulierung, die in früheren Permeationsuntersuchungen mit exzidiertem Stratum corneum [Stoye, 1997] und mit humanen Hautmodellen [Specht, 1998] eingesetzt wurde, und deren Permeationsverhalten damals mit der Permeation von Ibuprofensäure aus einem weiteren Fertigarzneimittel dem Dolgit Mikrogel (Ibuprofensäure, 5 %ig in einer kubischen Gelgrundlage) verglichen wurde. Die vergleichende Permeation der beiden Präparate durch exzidiertes Stratum corneum zeigte dahingehend Unterschiede im Permeationsverhalten, dass Ibuprofensäure aus dem Dolgit Mikrogel das Stratum corneum um den Faktor 3 schneller permeierte als die Ibuprofensäure aus der Ibutop Creme. Die Gründe für das unterschiedliche Permeationsverhalten liegen in den unterschiedlichen Grundlagen der beiden Fertigarzneimittel. Bei der Permeation durch Hautmodelle konnte Specht (1998) für beide Fertigarzneimittel eine höhere Permeabilität nachweisen, die Ibuprofensäure permeierte aus der Ibutop Creme mit dem Faktor 20 und aus dem Dolgit Mikrogel um den Faktor 27 schneller als durch exzidiertes Stratum corneum.

Da die Ibuprofensäure aus dem Dolgit Mikrogel mit dem Faktor 3,9 schneller durch das Hautmodell als aus der Ibutop Creme permeierte, ist somit die Permeation der beiden Zubereitungen ähnlich wie bei exzidiertem Stratum corneum

#### 4.4.1.1. Permeabilität der humanen Hautmodelle

Bei den Permeationsuntersuchungen von Ibuprofensäure aus Ibutop Creme ging es zuerst darum, die Permeationsbarriere der Hautmodelle zum jetzigen Zeitpunkt mit der Permeationsbarriere in einer früheren Arbeit [Specht, 1998] zu vergleichen (Tabelle 4.3). Eine deutliche Veränderung der Permeabilität der Hautmodelle, die aus dem gleichen Zellmaterial aufgebaut sind, könnte z.B. eine Veränderung der Zellen während der Lagerung als Ursache haben.

*Tabelle 4.3: Vergleich der Permeationsbarriere der Hautmodelle (1998 und jetzt) für Ibuprofen aus Ibutop Creme*

	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-7}$ cm/s] n= 3 [Specht, 1998]	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-7}$ cm/s] n= 9
ASC	$7,62 \pm 1,1$	$8,24 \pm 0,83$

In der Tabelle 4.3 ist zu erkennen, dass die Permeationsbarriere der Hautmodelle mit den Ergebnissen von Specht (1998) vergleichbar ist. Durch die Kryokonservierung und Lagerung der Zelllinien sind keine Veränderungen der Zellen eingetreten, die sich in einer veränderten Permeationsbarriere der späteren Hautmodelle bemerkbar machen.

#### 4.4.1.2. Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle

Die Kultivierungszeit der Hautmodelle beträgt 28 Tage, so dass bei der Versuchsplanung immer ein gewisser Vorlauf berücksichtigt werden muss. Vor diesem Hintergrund ist es interessant zu wissen, ob eine kürzere Kultivierung vergleichbare Ergebnisse im Hinblick auf die Permeationsbarriere der Hautmodelle liefert.

Die rheologischen Untersuchungen (s. Abschnitt 4.3.5.) haben gezeigt, dass nach einer Kultivierungszeit von 21 Tagen die Kontraktion des Gelgerüsts abgeschlossen ist und danach keine messbaren strukturellen Veränderungen im Hautmodell mehr auftreten. Allerdings zeigten die mikroskopischen Bilder des Querschnitts der Hautmodelle eine deutliche

Zunahme der Epidermisschichten in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (s. Abschnitt 4.2.1.). Insbesondere zwischen Tag 21 und Tag 28 der Kultivierung nimmt die Dicke der Epidermis und damit die eigentliche Permeationsbarriere des Hautmodells noch deutlich zu.

Ein Problem bei den Permeationsuntersuchungen der Hautmodelle zu verschiedenen Kultivierungszeiten war die Beschaffenheit der Hautmodelle in den ersten 2 Wochen der Kultivierung. Durch die submerse Kultivierung in dieser Zeit war sehr viel Flüssigkeit aus dem Kultivierungsmedium im Kollagengerüst des Dermisäquivalents inkorporiert, die erst durch die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze und die vollständige Kontraktion des Gelgerüsts verdrängt wurde. Vergleichende Permeationsuntersuchungen in der modifizierten Franz-Zelle waren daher nicht durchzuführen, denn durch das Einspannen der Hautmodelle zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment wurde die Flüssigkeit aus dem Hautmodell herausgedrückt und führte zu einer Verdünnung des Donorkompartiments, wodurch sich die Ausgangskonzentration des Arzneistoffs im Donor veränderte. Aus diesem Grund wurde die Permeation wie in Abschnitt 3.2.5. beschrieben direkt in den Transwell-Einsätzen der Sixwell-Zellkulturplatten durchgeführt.

Die Abbildungen 4.28 und 4.29 zeigen die permeierte Wirkstoffmenge für Ibutop Creme durch die Hautmodelle bei Raumtemperatur und in Anlehnung an die In-vivo-Bedingungen und die sonst üblichen Permeationsbedingungen bei 37 °C. In Tabelle 4.4 sind die Permeationskoeffizienten zur besseren Übersicht gegenüber gestellt.

Es wird deutlich, dass bei Raumtemperatur (Abbildung 4.28) der Arzneistoff in geringerem Maße durch das Hautmodell permeierte als bei erhöhter Temperatur (Abbildung 4.29). Auffällig ist ebenso die Tatsache, dass sich kaum Unterschiede im Permeationsverlauf für die Hautmodelle in den unterschiedlichen Kultivierungsstadien (nach 7, 14, 21 und 28 Tagen der Kultivierung) ergeben haben. Der Wirkstoff permeierte zwar sowohl bei Raumtemperatur als auch bei erhöhter Temperatur am schnellsten durch das Hautmodell, das nur eine Woche kultiviert wurde, also noch keine Epidermis besitzt, allerdings sind die Unterschiede zu den anderen Permeationsergebnissen nach 14, 21 und 28 Tagen nur wenig ausgeprägt. Dies Ergebnis spiegelt sich auch im Vergleich der Permeationskoeffizienten (Tabelle 4.4) wieder.

Tabelle 4.4: Vergleich der Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch Hautmodelle in verschiedenen Kultivierungsstadien bei Raumtemperatur und bei 37 °C ( $n = 6$ )

Dauer der Kultivierung [d]	Permeation bei Raumtemperatur Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-7}$ cm/s]	Permeation bei 37 °C Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-7}$ cm/s]
7	$8,93 \pm 0,52$	$11,89 \pm 0,38$
14	$5,847 \pm 0,39$	$9,27 \pm 1,19$
21	$7,267 \pm 1,00$	$9,25 \pm 0,70$
28	$8,483 \pm 0,62$	$11,64 \pm 0,80$

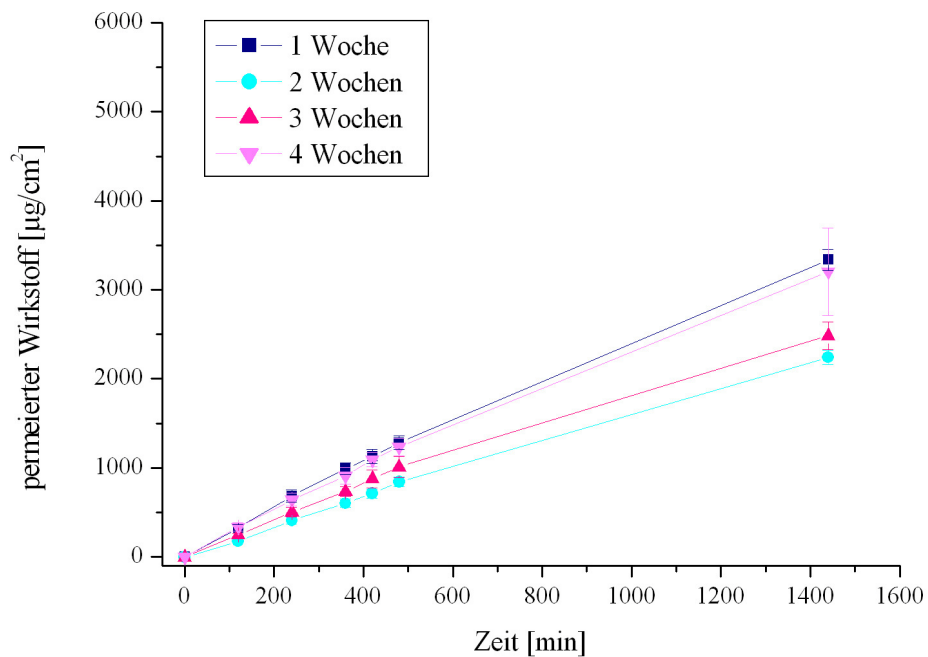


Abbildung 4.28: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch ASC verschiedener Kultivierungsstadien bei Raumtemperatur ( $n = 6$ )

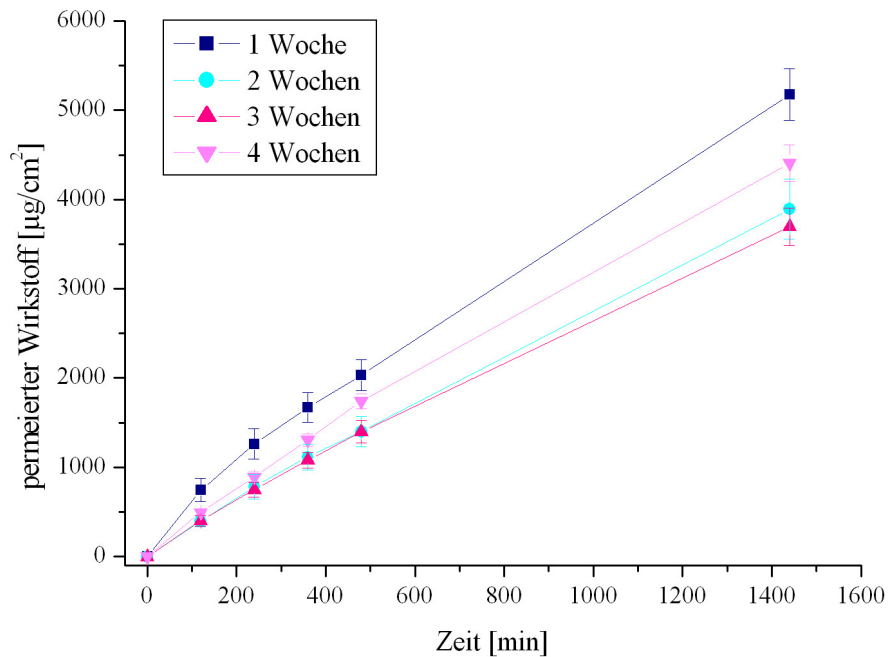


Abbildung 4.29: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch ASC verschiedener Kultivierungsstadien bei 37 °C ( $n = 6$ )

Als mögliche Ursache der nahezu vergleichbaren Permeationsbarrieren muss die Beschaffenheit der Hautmodelle zu den 4 verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung herangezogen werden. Durch die submerse Kultivierung hat das noch nicht vollständig kontrahierte Kollagengerüst nach 7 Tagen Kultivierung sehr viel Flüssigkeit aus dem Kultivierungsmedium gebunden, so dass der oben auf das Hautmodell aufgegebene Arzneistoff zwar noch keine ausgeprägte Permeationsbarriere in Form einer Epidermis überwinden muss, aber statt dessen eine längere Diffusionsstrecke durch das mit Flüssigkeit gefüllte und damit sehr hydrophile Kollagengerüst zurückzulegen hat, bevor er schließlich im Akzeptormedium ankommt. Nach 21 Tagen der Kultivierung ist nach den rheologischen Untersuchungen die Kontraktion vollständig abgeschlossen (s. Abschnitt 4.3.5.), und es ist deutlich weniger Flüssigkeit im Hautmodell gebunden, so dass der Diffusionsweg verkürzt ist. Allerdings ist durch die vorhandene Epidermisschicht eine zusätzliche Permeationsbarriere entstanden. Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten nach 21 und 28 Tagen fällt auf, dass nach 28 Tagen der Kultivierung der Permeationskoeffizient höher ist, also der Arzneistoff schneller pro Zeiteinheit durch das Hautmodell permeiert. Dieser Unterschied ist allerdings nur bei der Permeation bei 37 °C signifikant, aber mit Faktor 1,3

auch nicht entscheidend. Auffällig ist jedoch der Unterschied in den Permeationskoeffizienten, wenn man die Methode im Transwell-Einsatz mit den Ergebnissen in der modifizierten Franz-Zelle (s. Abschnitt 4.4.1.1.) vergleicht. Der Permeationskoeffizient, der mit der modifizierten Franz-Zelle erhalten wurde, war deutlich geringer. Dieses Phänomen kann auf die Temperatur zurückgeführt werden. Bei der Permeation in den Transwell-Einsätzen sind sowohl das Akzeptor- wie auch das Donorkompartiment auf 37 °C erwärmt, so dass durch die Temperaturerhöhung auch die Viskosität der Zubereitung abnimmt, und dadurch eine Permeation des Arzneistoffs erleichtert ist. Bei der modifizierten Franz-Zelle ist nur das Akzeptorkompartiment auf 37 °C erwärmt, die Viskosität der Zubereitung verändert sich nicht, und der Permeationskoeffizient ist dadurch geringer.

Insgesamt lässt sich bei den Permeationsuntersuchungen in den verschiedenen Kultivierungsstadien nicht von signifikanten Unterschieden sprechen. Das Hautmodell hat während der gesamten Zeit der Kultivierung eine Permeationsbarriere, die zu Beginn auf eine verlängerte Diffusionsstrecke durch die inkorporierte Flüssigkeit und erst später auf die entstandene Epidermisschicht zurückzuführen ist. Da aber erst nach einer Kultivierung von 3 Wochen keine weitere Kontraktion im Hautmodell mehr stattfand und erst nach 4 Wochen die Epidermis ausgeprägt war, wurde in den weiteren Untersuchungen eine Kultivierungszeit von 4 Wochen beibehalten.

#### **4.4.1.3. Einfluss der Kryokonservierung auf die Permeabilitätsbarriere der humanen Hautmodelle**

Eine weitere Möglichkeit der besseren Versuchsplanung wäre eine Herstellung der Hautmodelle im voraus, so dass sie bei Bedarf für die entsprechenden Permeationsversuche eingesetzt werden können. Da in Abschnitt 4.4.1.2. gezeigt wurde, dass eine kürzere Kultivierungsdauer als 28 Tage nicht sinnvoll erscheint, wurde basierend auf den Ergebnissen von Wassermann und Müller-Goymann (2000b) eine weitere Untersuchung zur Kryokonservierung der Hautmodelle durchgeführt. Nach einem definierten Einfriervorgang und einer Lagerung der Hautmodelle für 24 h in flüssigem Stickstoff bei -196 °C zeigte sich damals, dass sich nach einem definierten Auftauvorgang keine Unterschiede in der Permeationsbarriere der gefrorenen und nicht gefrorenen Hautmodelle ergaben (Tabelle 4.5).

*Tabelle 4.5: Einfluss der Kryokonservierung (24 h) auf die Permeationsbarriere der Hautmodelle [Wassermann und Müller-Goymann, 2000b]*

	ASC	tiefgefrorene ASC (24 h)
<b>Permeationskoeffizient</b> [x 10 <sup>-7</sup> cm/s]	7,70 ± 0,28	7,87 ± 0,44

Dieses Experiment wurde in dieser Arbeit wiederholt und dahin gehend modifiziert, dass die Hautmodelle nicht nur für 24 Stunden sondern für 6 Monate in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert wurden, eine Zeitspanne, die für die Herstellung der Hautmodelle im voraus durchaus realistisch erscheint. In Tabelle 4.6 ist zu erkennen, dass auch bei einer Kryokonservierung der Hautmodelle von 6 Monaten keine Veränderung in der Permeationsbarriere für den Arzneistoff Ibuprofen entsteht. Inwiefern sich allerdings die Kryokonservierung auf die Viabilität der Zellen auswirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da dies für die Permeationsuntersuchungen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

*Tabelle 4.6: Einfluss der Kryokonservierung (6 Monate) auf die Permeationsbarriere der Hautmodelle (n = 6)*

	ASC	tiefgefrorene ASC (6 Monate)
<b>Permeationskoeffizient</b> [x 10 <sup>-7</sup> cm/s]	8,24 ± 0,83	7,17 ± 0,70

#### **4.4.1.4. Einfluss der Sebozytenzelllinie SZ 95 auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle**

Durch die Inkorporation der Sebozytenzelllinie SZ 95 sollte die Fähigkeit der Sebozyten Lipide zu bilden und diese an das umgebende Medium abzugeben genutzt werden, um dadurch die Permeationsbarriere der Hautmodelle zu verbessern.

In den Abschnitten 2.1.3.4. und 2.1.5. sind die Funktion und die Zusammensetzung des Stratum corneum beschrieben. Die Lipide des Stratum corneum, deren Zusammensetzung auch durch das Sebum beeinflusst wird, haben eine große Bedeutung für die Barrierefunktion

der Epidermis. Daher ist auch die Zusammensetzung und die strukturelle Orientierung dieser Lipide in den Hautmodellen von besonderem Interesse.

Specht konnte 1998 zeigen, dass durch eine gezielte Supplementierung des Kulturmediums mit den essentiellen Fettsäuren Arachidon- und Linolsäure sowie den nichtessentiellen Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure die Permeabilität der Hautmodelle deutlich verringert werden kann. Der Permeabilitätskoeffizient ließ sich durch diese Zusätze um den Faktor 2 reduzieren. Da aber dennoch ein deutlicher Unterschied zwischen der Permeation durch exzidiertes humanes Stratum corneum und den Hautmodellen bestand, wurde von der sehr aufwendigen und kostenintensiven Fettsäuresupplementierung Abstand genommen. Es sollte im weiteren mit Hilfe einer lipidproduzierenden Zelllinie das Ziel der verbesserten Permeationsbarriere der Hautmodelle weiter verfolgt werden.

Dazu wurden die Hautmodelle wie in Abschnitt 3.2.2.2. beschrieben mit und ohne die Sebozytenzelllinie SZ 95 im Dermis- bzw. Epidermisäquivalent hergestellt und für die Permeation von Ibuprofensäure aus Ibutop Creme in der modifizierten Franz-Zelle eingesetzt. In Abbildung 4.30 sind die permeierten Arzneistoffmengen gegen die Zeit aufgetragen und in Tabelle 4.7 die ermittelten Permeationskoeffizienten gegenübergestellt.

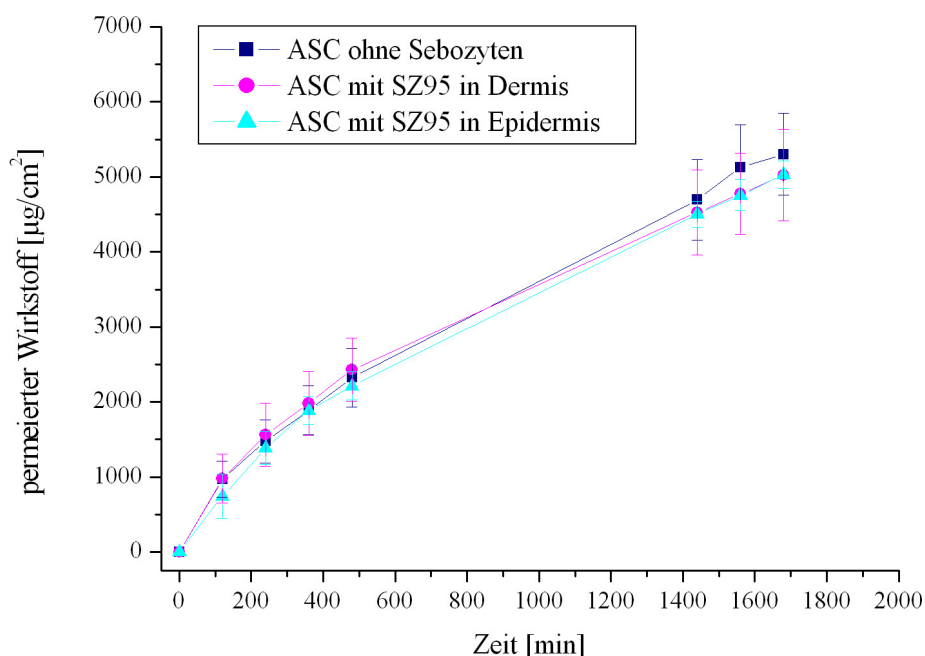


Abbildung 4.30: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch ASC ohne Sebozyten und mit inkorporierten Sebozyten im Dermis-/Epidermisäquivalent ( $n = 6$ )



In der graphischen Darstellung der Permeation von Ibuprofen (Abbildung 4.30) und auch im Vergleich der Permeationskoeffizienten (Tabelle 4.7) sind keine signifikanten Unterschiede im Permeationsverhalten des Arzneistoffs durch die Hautmodelle mit und ohne die Sebozytenzelllinie SZ 95 zu erkennen. Die Eigenschaft der Zelllinie SZ 95 u.a. die für die Sebozyten typischen Sebumlipide zu produzieren, kann also durch die Cokultivierung der Zelllinie im Hautmodell nicht dazu genutzt werden, die Permeationsbarriere der Hautmodelle zu verbessern. Sofern überhaupt Lipide in das Medium abgegeben werden sollten, haben sie keinen Einfluss auf die Hautmodelle, bzw. den Lipidgehalt insbesondere der Epidermis. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen der Lipidanalytik (s. Abschnitt 4.3.4.). Bei dieser Untersuchung konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Lipidmengen der Hautmodelle mit und ohne die Sebozytenzelllinie SZ 95 gefunden werden.

*Tabelle 4.7: Vergleich der Permeationskoeffizienten für die Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch Hautmodelle mit und ohne inkorporierte Sebozyten (n=6)*

	ASC	ASC mit SZ 95 im Dermisäquivalent	ASC mit SZ 95 im Epidermisäquivalent
<b>Permeationskoeffizient</b> [x 10 <sup>-7</sup> cm/s]	8,24 ± 0,83	7,83 ± 0,74	7,52 ± 0,75

#### **4.4.1.5. Einfluss unterschiedlicher Kollagenmatrices auf die Permeabilität der humanen Hautmodelle**

Zur Herstellung der Dermisäquivalente der Hautmodelle musste zeitweise auf ein kommerzielles Kollagen zurückgegriffen werden, da keine ausreichende Menge an Rattenschwänzen für die Extraktion von Kollagen Typ I aus den Sehnen zur Verfügung stand. Um die Eignung dieser Hautmodelle für die Permeationsuntersuchungen zu testen, wurde wiederum Ibuprofen als Donor eingesetzt, und die Permeation mit den Hautmodellen, deren Dermisäquivalent aus Rattenschwanzkollagen hergestellt wurde, verglichen.

In Abbildung 4.31 ist deutlich zu erkennen, dass beide Hautmodelle vergleichbare Barriereigenschaften aufweisen. Da es sich bei dem kommerziellen Kollagen um ein hochgereinigtes Produkt handelt, wurde es in einer halb so hohen Ausgangskonzentration für die Herstellung des Dermisäquivalents eingesetzt. Diese Konzentration ist aber ausreichend, um aus dem entstandenen Dermisäquivalent ein Hautmodell aufzubauen, das die gleiche

Permeationsbarriere besitzt wie die Hautmodelle aus Rattenschwanzkollagen. In Tabelle 4.8 sind die Permeationskoeffizienten für die beiden Permeationsbarrieren noch einmal gegenüber gestellt.

Da der Mangel an Rattenschwänzen aber nur zeitweise bestand, wurde in den weiteren Untersuchungen wieder das selbstisolierte Kollagen aus Rattenschwanzsehnen eingesetzt. Es ist zwar eine sehr langwierige Prozedur das Kollagen zu gewinnen und aufzureinigen, aber für eine universitäre Einrichtung ist es deutlich kostengünstiger und damit vorzuziehen.

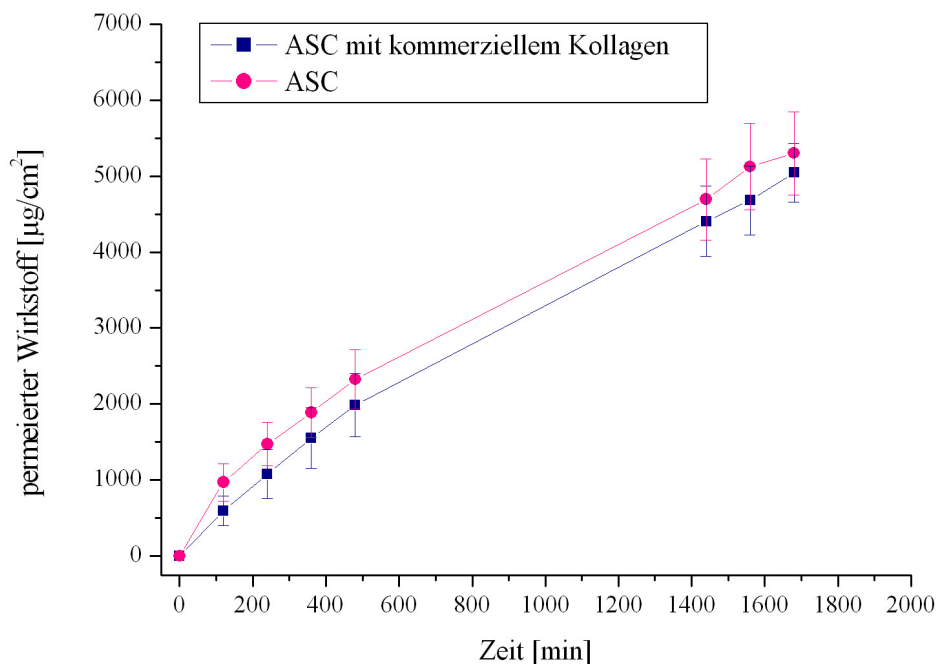


Abbildung 4.31: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch Hautmodelle, deren Dermisäquivalente zum einen aus Rattenschwanzkollagen und zum anderen aus einem kommerziellen Kollagen hergestellt wurden ( $n = 6$ )

Tabelle 4.8: Einfluss der Kollagenart im Dermisäquivalent der Hautmodelle auf die Permeationskoeffizienten für die Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme ( $n=6$ )

	ASC	ASC mit IBFB-Kollagen
<b>Permeationskoeffizient</b> [x 10 <sup>-7</sup> cm/s]	8,24 ± 0,83	8,41 ± 0,34

#### 4.4.1.6. Permeation durch kommerzielle Hautmodelle

Um die Permeationsbarriere unserer Hautmodelle besser beurteilen und einordnen zu können, wurden kommerzielle Hautmodelle zum Vergleich herangezogen.

In ersten Untersuchungen sollte die Vergleichbarkeit mit einem kommerziellen Vollhautmodell dem AST-2000 der Firma Cellsystems (s. Abschnitt 3.1.2.1.) untersucht werden. Zur Herstellung des Hautmodells wurden wie auch bei unserem Hautmodell für das Dermisäquivalent humane dermale Fibroblasten eingesetzt. Für das Epidermisäquivalent wurden allerdings anstatt der immortalisierten HaCaT-Zelllinie native humane Keratinozyten verwendet. In Abbildung 4.32 sind die permeierten Wirkstoffmengen pro Zeit für beide Vollhautmodelle aufgetragen, und es sind keine signifikanten Unterschiede in der Barriereeigenschaft der beiden Hautmodelle zu erkennen. Die unterschiedlichen Epidermisäquivalente, die zum einen aus immortalisierten Zellen und zum anderen aus nativen Zellen ausgebildet wurden, bilden also eine vergleichbare Permeationsbarriere aus.

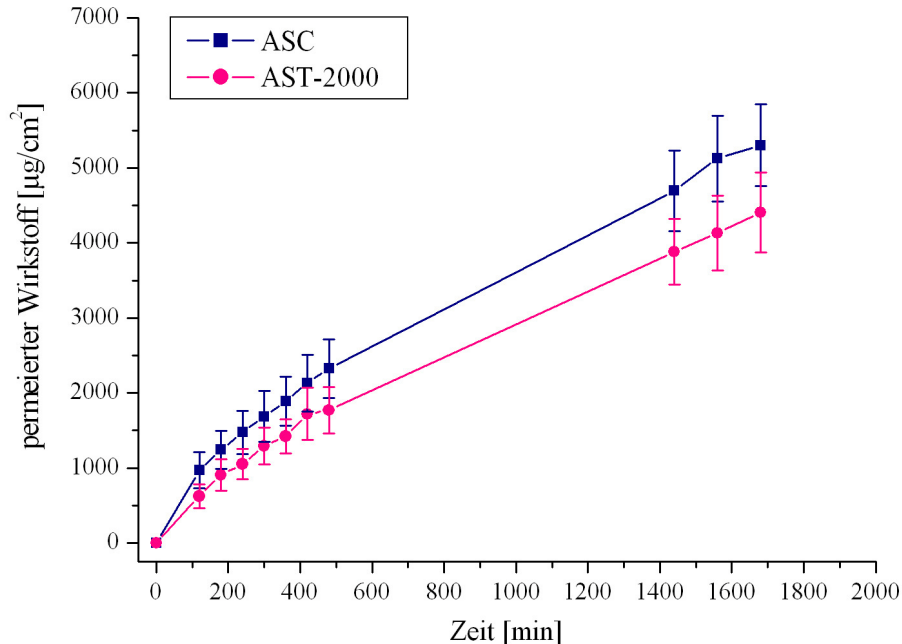


Abbildung 4.32: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch unsere Hautmodelle im Vergleich zu einem kommerziellen Vollhautmodell ( $n = 6$ )

Da eine Vielzahl von reinen Epidermismodellen auf dem Markt erhältlich ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Permeation von Ibuprofensäure durch die beiden kommerziellen Epidermismodelle Epiderm und Skinethic untersucht. Es handelt sich hierbei um reine Epidermismodelle, die auf unterschiedlichen Filtermaterialien kultiviert werden und in mikroskopischen Aufnahmen ein ausgeprägtes Stratum corneum aufweisen. Beide Modelle sind in Abschnitt 3.1.2. ausführlich beschrieben. Ziel der Untersuchung war es, zuerst die Permeationsbarrieren beider Epidermismodelle untereinander und danach mit denen der Vollhautmodelle zu vergleichen.

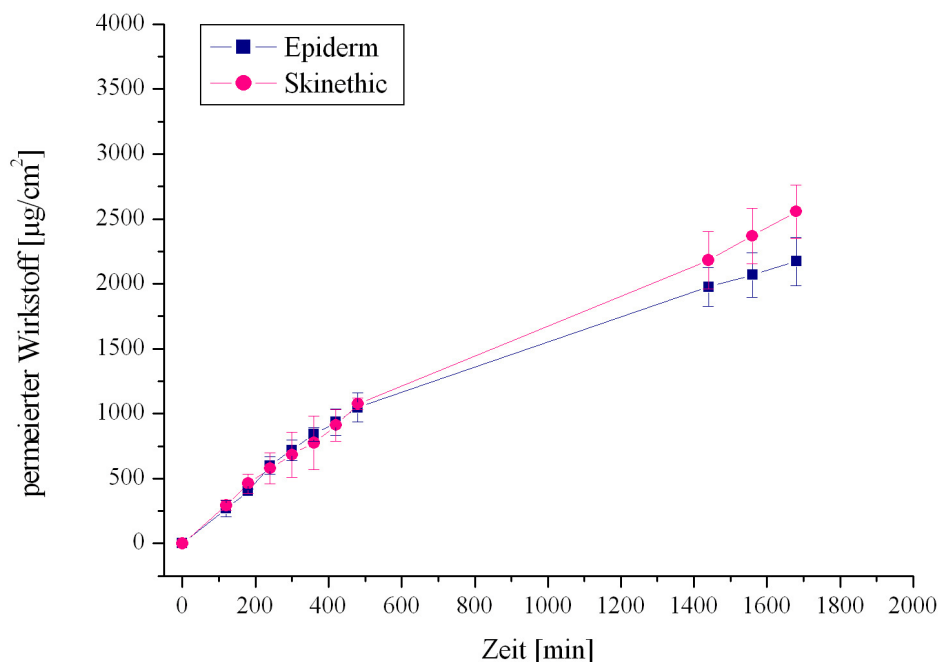


Abbildung 4.33: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch die Epidermismodelle Epiderm ( $n=4$ ) und Skinethic ( $n = 3$ )

In der graphischen Darstellung (Abbildung 4.33) ist zu erkennen, dass kein Unterschied in der Barriereeigenschaft der beiden Epidermismodelle besteht.

Werden zur besseren Übersicht die Ergebnisse aller Modelle gemeinsam graphisch dargestellt (Abbildung 4.34), wird deutlich, dass die Epidermismodelle eine signifikant bessere Permeationsbarriere ausbilden als die beiden Vollhautmodelle. Ein Vergleich der Permeationskoeffizienten (Tabelle 4.9) untermauert das Ergebnis und zeigt eine um den

Faktor 2 schnellere Permeation des Arzneistoffs durch die Vollhautmodelle. Der Einfluss des Dermisäquivalents in den beiden Vollhautmodellen auf die Permeationsbarriere scheint nicht relevant zu sein. Eine deutlich ausgeprägte Epidermis mit Stratum corneum bildet eine sehr viel bessere Permeationsbarriere aus als die Anwesenheit von dermalen Schichten. Beim Vergleich mit humanem Stratum corneum schneiden allerdings alle Modelle als sehr viel durchlässiger ab, die Vollhautmodelle verglichen mit den Ergebnissen von Stoye (1997) um den Faktor 20 und die Epidermismodelle um den Faktor 10 für den Arzneistoff Ibuprofen aus Ibutop Creme.

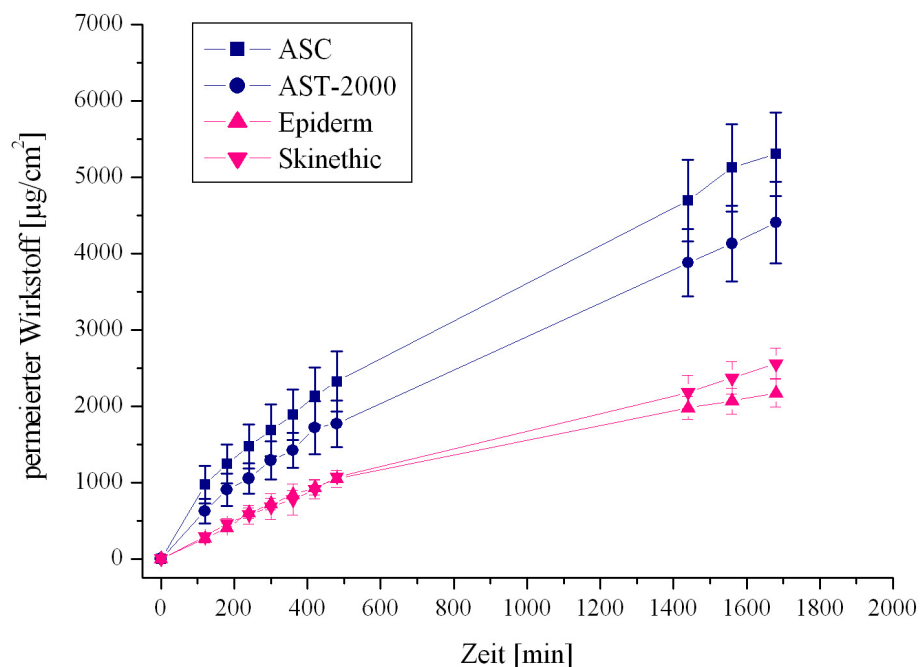


Abbildung 4.34: Permeation von Ibuprofen aus Ibutop Creme durch die Vollhaut- und Epidermismodelle

Tabelle 4.9: Vergleich der Permeationskoeffizienten durch verschiedene Vollhaut- und Epidermismodelle

	Vollhautmodelle		Epidermismodelle	
	ASC n=9	AST 2000 n=6	Epiderm n=4	Skinethic n=3
<b>Permeationskoeffizient</b> [x 10 <sup>-7</sup> cm/s]	8,24 ± 0,83	7.87 ± 0.44	3.15 ± 0.24	4.03 ± 0.49

#### **4.4.1.7. Zusammenfassende Diskussion zum Permeationsverhalten ibuprofenhaltiger Zubereitungen durch humane Hautmodelle**

Die ersten Untersuchungen mit Ibuprofen als Modellarzneistoff in Anlehnung an früher durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass die Permeationsbarriere der organotypischen Hautmodelle zum Zeitpunkt dieser Arbeit identisch mit den Ergebnissen von Specht (1998) ist. Durch die Kryokonservierung und die Kultivierung der Zelllinien ist keine Alterung der Zellen aufgetreten, die sich in veränderten Permeationseigenschaften der fertigen Hautmodelle äußert. Dies Ergebnis war nach den Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Fibroblasten und Keratinozyten, bei denen eher ein verbessertes Wachstum als vor 10 Jahren gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 4.1.2), auch zu erwarten gewesen. Der Arzneistoff permeiert also um den Faktor 20 schneller durch die organotypischen Hautmodelle als durch exzidiertes humanes Stratum corneum [Stoye, 1997].

In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass eine kürzere Kultivierung als die ursprünglichen 4 Wochen nicht von Vorteil ist, da erst nach 4 Wochen eine mehrschichtige Epidermis entstanden ist, die für eine entsprechende Permeationsbarriere sorgt. Vorher ist hauptsächlich durch die inkorporierte Flüssigkeit aus dem Kulturmedium ein verlängerter Diffusionsweg für den Arzneistoff vorhanden, der eine Permeationsbarriere vortäuscht. Zur Vereinfachung der Versuchsplanung von Permeationsexperimenten bietet sich somit nur die Kryokonservierung an. Bei einer Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  bleibt die Permeationsbarriere der Hautmodelle erhalten, so dass die Hautmodelle bis zu 6 Monate im voraus hergestellt werden können.

Mit Hilfe der Lipidanalytik konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Vergleich der Hautmodelle mit nativer Haut gewonnen werden, und auch eine Erhöhung der Lipidmengen durch die Inkorporation der lipidproduzierenden Zelllinie SZ 95 konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.3.4.). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass auch bei den Permeationsuntersuchungen keine Unterschiede in der Permeationsbarriere der Hautmodelle mit und ohne inkorporierte Sebozyten auftraten.

Durch den Austausch des selbstisolierten Kollagens aus Rattenschwanzsehnen gegen ein kommerzielles Kollagen wurde die Permeationsbarriere der Hautmodelle ebenso wenig verändert, obwohl in den rheologischen Untersuchungen Unterschiede bei der Kontraktion der Kollagengele zu erkennen waren.

Beim Vergleich des humanen Hautmodells mit einem kommerziellen Vollhautmodell, dem AST-2000, zeigten beide Vollhautmodelle eine vergleichbare Permeationsbarriere für den

Modellarzneistoff Ibuprofen. Da die Permeationsbarriere hauptsächlich durch die Epidermis und damit durch die aufgesäten Keratinozyten entsteht, bilden also die transformierten HaCaT-Zellen auf einem dermalen Substrat eine vergleichbare Permeationsbarriere aus wie native Keratinozyten. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Specht (1998), der ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Permeabilität nativer und transformierter Kulturen bestimmen konnte. Die kommerziellen Epidermismodelle Epiderm und Skinethic sind für den Arzneistoff Ibuprofen nur halb so durchlässig wie die beiden Vollhautmodelle. Auch ohne Dermis als Substrat bilden die Epidermismodelle eine stärkere Permeationsbarriere aus, und weisen laut Herstellerangaben eine deutliche Stratifizierung der Epidermis auf, die für die ausgeprägtere Permeationsbarriere verantwortlich ist. Allerdings erreichen weder die Vollhautmodelle noch die Epidermismodelle eine vergleichbare Permeationsbarriere wie exzidiertes humanes Stratum corneum.

#### **4.4.2. Permeationsuntersuchungen clindamycinhaltiger Formulierungen durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle**

Für weitere Permeationsuntersuchungen wurden zwei verschiedene Zubereitungen mit dem Arzneistoff Clindamycindihydrogenphosphat eingesetzt, um den Einfluss der Grundlage auf die Permeation des Arzneistoffs durch die Hautmodelle und das humane Stratum corneum zu untersuchen. Clindamycin ist das effektivste Antibiotikum in der lokalen Aknetherapie [Rumsfield und West, 1992] und wird aufgrund der geringen Nebenwirkungen gern als Alternative zur systemischen Antibiotikatherapie eingesetzt.

Untersuchungen von Specht (1998) und Stoye (1997) haben gezeigt, dass für den Arzneistoff Ibuprofensäure deutliche Unterschiede im Permeationsverhalten in Abhängigkeit der Grundlage bestehen. So permeiert Ibuprofensäure aus einem Mikrogel sowohl durch die Hautmodelle wie auch durch exzidiertes Stratum corneum deutlich verbessert als aus der Cremeformulierung.

##### **4.4.2.1. Einfluss der unterschiedlichen Grundlagen von Basocin Akne Gel und Lösung auf die Permeation von Clindamycin**

Bei den beiden untersuchten Formulierungen handelt es sich um Basocin Akne Gel und Basocin Akne Lösung mit jeweils 1 % Clindamycinphosphat. Die Grundlage des Gels ist ein Polyacrylatgel, und die Lösung besteht hauptsächlich aus Isopropylalkohol (s. Abschnitt 3.1.1.2.).

In den Abbildungen 4.35 und 4.36 sind die Permeationsverläufe für Clindamycinphosphat aus den beiden unterschiedlichen Grundlagen (Gel und Lösung) durch Hautmodelle und exzidiertes humanes Stratum corneum dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.10 zu finden, in der die Permeationskoeffizienten gegenübergestellt sind und die entsprechenden Faktoren errechnet wurden.

Die Permeationsprofile des Arzneistoffs aus beiden Formulierungen durch die Hautmodelle (Abbildung 4.35) sind sehr ähnlich (Faktor 1,4), während es deutliche Unterschiede bei den Permeationsprofilen durch exzidiertes humanes Stratum corneum (Abbildung 4.36) gibt (Faktor 3,6). Vergleicht man nun die Permeation aus einer Formulierung durch Hautmodelle und humanes Stratum corneum, so permeiert der Arzneistoff Clindamycinphosphat aus Basocin Akne Gel 125-mal schneller durch die Hautmodelle als durch Stratum corneum. Im



Gegensatz dazu ergibt sich für die Permeation des Arzneistoffes aus Basocin Akne Lösung nur eine 48-mal so schnelle Permeation durch die Hautmodelle (Tabelle 4.10).

Die Permeation aus der flüssigen Zubereitung ist im Gegensatz zu der Gelformulierung bei beiden Permeationsbarrieren verbessert. Allerdings ist dieser Effekt beim humanen Stratum corneum sehr viel deutlicher ausgeprägt. Eine mögliche Ursache dafür ist der Enhancereffekt des Isopropylalkohols.

Der Isopropylalkohol interagiert mit den Lipiden des Stratum corneums und zwar in dem Maße, dass ein direkter Einfluss auf die wässrigen Regionen der polaren Kopfgruppen der Lipidbilayer ausgeübt wird. Die Enhancermoleküle penetrieren in diesen Bereich, weiten die Strukturen auf und verändern dort die Löslichkeit für Arzneistoffe, was in einem Anstieg des Arzneistofffluxes resultiert [Bennet et al., 1985].

In Abschnitt 4.2.1. ist ein Querschnitt des Hautmodells abgebildet und es ist zu erkennen, dass zwar eine mehrschichtige Epidermis im Hautmodell ausgebildet wird, diese allerdings nicht mit einem ausgeprägten Stratum corneum abschließt. Dadurch fehlen im Hautmodell auch eine Menge an Stratum corneum Lipiden (s. Abschnitt 4.3.4.), mit denen der Enhancer Isopropylalkohol interagieren kann, weshalb ein geringerer Einfluss des Enhancers im Hautmodell verglichen mit exzidiertem humanen Stratum corneum resultiert.

*Tabelle 4.10: Vergleich der Permeationskoeffizienten  $K_p$  für Clindamycinphosphat aus Basocin Akne Gel und Basocin Akne Lösung durch Hautmodelle und humanes Stratum corneum*

	<b>humanes Stratum Corneum</b> <b>n=4</b>	<b>ASC</b> <b>n=6</b>	<i>Faktor</i>
<b><math>K_p</math> [cm/s]</b> Basocin® Akne Gel	$2.27 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0.39 \cdot 10^{-8}$	$2.83 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0.24 \cdot 10^{-6}$	125
<b><math>K_p</math> [cm/s]</b> Basocin® Akne Lösung	$8.17 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0.70 \cdot 10^{-8}$	$3.93 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0.61 \cdot 10^{-6}$	48
<b>Faktor</b>	3.6	1.4	----

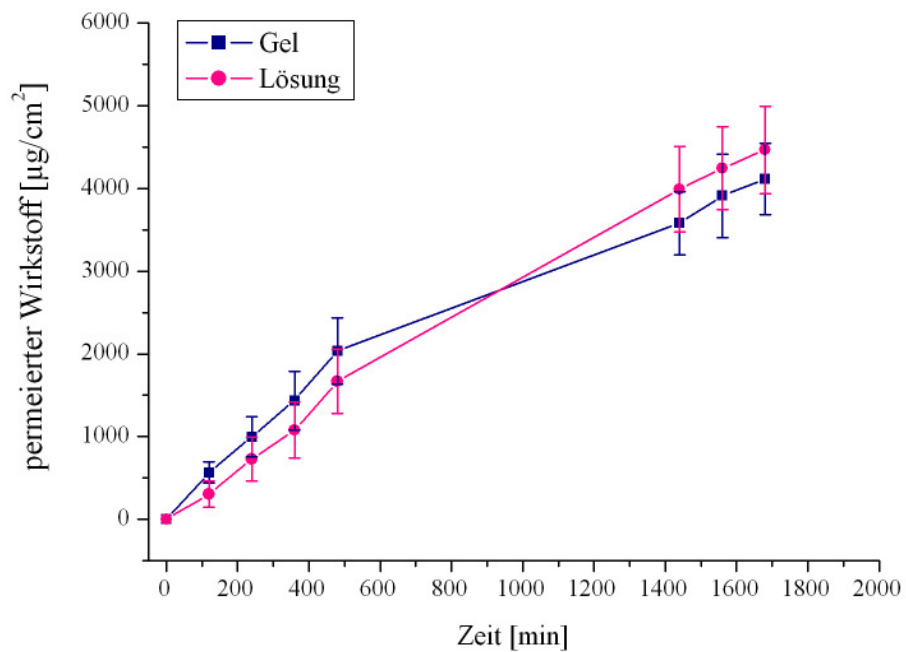


Abbildung 4.35: Permeation von Clindamycinphosphat aus Basocin Akne Gel und Basocin Akne Lösung durch Hautmodelle (n=6)

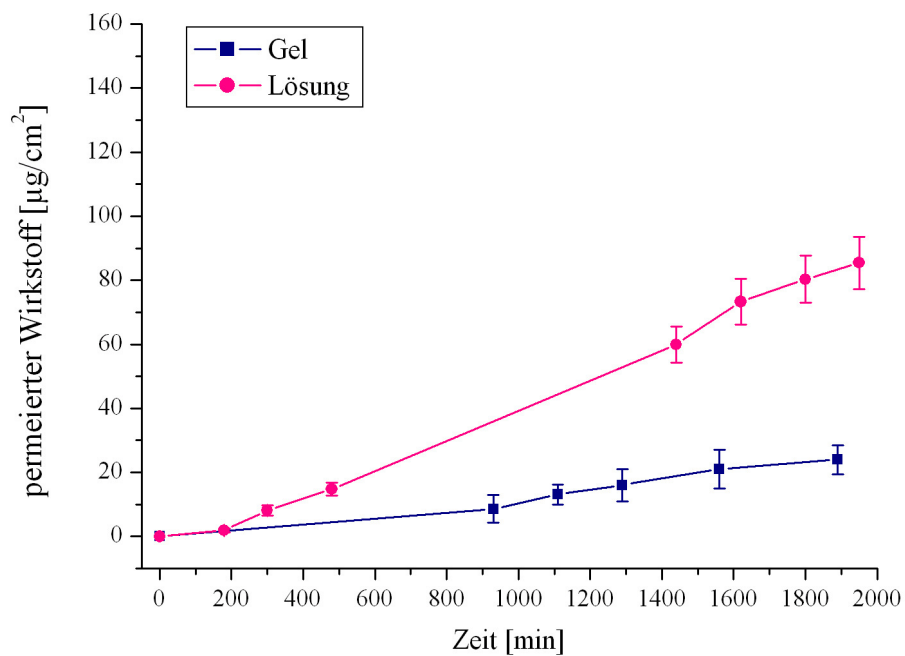


Abbildung 4.36: Permeation von Clindamycinphosphat aus Basocin Akne Gel und Basocin Akne Lösung durch humanes Stratum corneum (n=4)

#### **4.4.2.2. Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von clindamycinhaltigen Formulierungen durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle**

Bei den hier durchgeführten Permeationsuntersuchungen des Arzneistoffs Clindamycin-dihydrogenphosphat aus zwei verschiedenen Grundlagen durch organotypische Hautmodelle und exzidiertes humanes Stratum corneum wird deutlich, dass es keinen allgemeingültigen Faktor zwischen der Permeabilität der Hautmodelle und dem Stratum corneum gibt. Dieser Faktor hängt deutlich von der gewählten Grundlage ab und ist im Vergleich mit den Permeationsdaten von Ibuprofen für jeden Arzneistoff spezifisch, wobei allerdings, wie auch in Abschnitt 4.4.1.7. beschrieben ist, die Hautmodelle immer durchlässiger als das exzidierte Stratum corneum sind.

Als mögliche Ursache ist zum einen die deutlich verringerte Barriereeigenschaft der Hautmodelle aufgrund der geringen Menge an Lipiden zu nennen, und zum anderen, dass sie im Vergleich mit der menschlichen Haut ein insgesamt sehr hydrophiles Gebilde darstellen. Dadurch entstehen natürlich mit den verschiedenen Grundlagen und Arzneistoffen andere Wechselwirkungen als mit dem Stratum corneum, so dass daraus auch unterschiedliche Permeationen der Arzneistoffe resultieren.

Im vorliegenden Beispiel ist der Enhancer-Effekt des in der einen Zubereitung enthaltenen Isopropylalkohols aufgrund der fehlenden Lipidschichten im Hautmodell nur gering ausgeprägt, während er beim exzidierten Stratum corneum zu einer deutlich erhöhten Permeation des Arzneistoffes im Gegensatz zur Gelgrundlage ohne Enhancer führt.

## **5. Abschlussdiskussion**

### **5.1. Kultivierung und Charakterisierung der humanen Zelllinien**

Für weiterführende Untersuchungen an den humanen organotypischen Hautmodellen ist es unerlässlich zuerst einmal das Ausgangszellmaterial genauer zu charakterisieren. Für die Hautmodelle wurden native und transformierte Zellen eingesetzt. Sowohl die nativen humanen dermalen Fibroblasten als auch die immortalisierte Zelllinie HaCaT sind seit nunmehr 16 Jahren in unserem Institut in Kultur. Im Gegensatz dazu wurde die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 für die vorliegende Arbeit neu in Kultur genommen. Die Transformation der HaCaT-Zellen erfolgte spontan und nicht virusinduziert, wodurch diese Zelllinie als Charakteristikum ein relativ hohes Differenzierungspotential aufweist, kombiniert mit einer genetischen Stabilität über viele Passagen [Boukamp et al., 1988].

Mit Hilfe des SV40 large-T Antigen wurden menschliche Sebozyten transformiert, so dass die immortalisierte Sebozytenzelllinie SZ 95 entstand, die die gleichen morphologischen, phenotypischen und funktionalen Charakteristika aufweist wie normale menschliche Sebozyten. Charakteristisch für diese Zelllinie ist u.a. die Lipidsynthese von Squalen, Wachsesteren, freien Fettsäuren und Triglyceriden [Zouboulis et al., 1999].

Dadurch dass es sich bei den humanen dermalen Fibroblasten um native Zellen handelt, sind sie nur begrenzt zu kultivieren und zeigten meist ab Passage 12 Alterungserscheinungen, wie z.B. ein deutlich verlangsamtes Wachstum und eine Veränderung ihrer Gestalt.

In Kultur zeichneten sich alle 3 Zelllinien durch ihre hohe Proliferationsrate aus. Während der Untersuchungen zum Wachstumsverhalten zeigten die Fibroblasten und Keratinozyten ein ähnliches exponentielles Wachstum bis zur Konfluenz. Insgesamt war sogar ein deutlich verbessertes Wachstumsverhalten beider Zelllinien als vor 8 Jahren zu beobachten. Die Sebozytenzelllinie SZ 95 zeigte dagegen ein langsames Wachstum in Kultur, allerdings einen ebenso sigmoiden Verlauf mit einer hohen Sättigungsdichte.

Alle Zelllinien wurden vor den Untersuchungen in flüssigem Stickstoff gelagert. Diese Kryokonservierung ist notwendig, um im Hinblick auf die Kultivierung eines standardisierten Hautmodells auf Zellmaterial mit gleichen Eigenschaften zurückgreifen zu können. Durch die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten wird deutlich, dass bei den Zellen durch die Langzeitkonservierung keine Veränderungen aufgetreten sind. Dies wird auch in den mikroskopischen Aufnahmen deutlich, da die Morphologie der Fibroblasten und Keratinozyten im Vergleich zu früheren Untersuchungen gleichgeblieben ist.

## **5.2. Aufbau und Charakterisierung der humanen Hautmodelle**

Das Ziel eine mehrschichtige ausdifferenzierte Epidermis in Kultur zu erhalten, ist für adhärent wachsende Zellen bei der üblichen Kultivierungsmethode nicht möglich. Die Morphologie der kultivierten Zellen ist in hohem Maße von den Kultivierungsbedingungen abhängig. In Submerskultur bilden die Keratinozyten nur 1-2 Zellschichten aus, und es ist keine Ähnlichkeit mit einer Epidermis detektierbar [Specht, 1998]. Damit die Keratinozyten mehrschichtig wachsen, ist eine Annäherung der Kultivierung an die In-vivo-Bedingungen notwendig. Durch die Kultivierung auf einer dermalen Matrix in Kombination mit dermalen Fibroblasten und an der Luft-Mediumgrenze wird Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten stimuliert. Auf diese Art und Weise werden die Keratinozyten wie in der Haut nur von unten mit Nährstoffen versorgt und können so die verschiedenen Epidermisschichten ausbilden [Robert et al., 1994]. Als geeignetes Substrat hat sich für die Kultivierung ein Kollagengel mit darin eingelagerten Fibroblasten erwiesen. Die Fibroblasten sind in dem Gel völlig vom Kollagen umschlossen und zeigen nicht das hyperproliferative Wachstum einer Monolayerkultur [Triglia et al., 1991], sondern kontrahieren in Abhängigkeit ihrer Zellzahl und der Kollagenkonzentration das Kollagengel [Bell et al., 1979]. Werden HaCaT-Zellen auf diesem Substrat nach einer Woche submerser Kultivierung für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, ist die Morphologie der Zellen einer humanen Epidermis sehr ähnlich. Durch die Verwendung eines Mediums mit reduziertem Serumgehalt und dem entsprechenden Substrat sind bei Anwesenheit dermalen Zellen die HaCaT-Zellen wie auch native Keratinozyten in der Lage eine mehrschichtige Epidermis mit unterschiedlichen Zellschichten und einem durchgängigen Stratum corneum zu bilden [Specht, 1998]. Damit können die Versuche von Boukamp et al. (1988) in vitro nachgewiesen werden, die zeigen konnten, dass nach einer Transplantation der HaCaT-Zellen auf thymuslose Nacktmäuse eine vielschichtige und ausdifferenzierte Epidermis entsteht.

Nach Anfertigung histologischer Schnittpräparate der Hautmodelle konnte auch in dieser Arbeit eine Ähnlichkeit zum Gewebe in vivo gefunden werden. Es zeigte sich schon nach 3 Wochen Kultivierung ein mehrschichtiges Wachstum der HaCaT-Zellen auf dem fibroblastenhaltigen Kollagengel, während nach 4 Wochen ein deutliches Abflachen der Zellen zur Oberfläche hin zu beobachten ist. Auch basalmembranähnliche Strukturen, die das Adhäsionsprotein Laminin enthalten, konnten im Hautmodell detektiert werden. Allerdings war es in dieser Arbeit nicht möglich ein ausgeprägtes Stratum corneum, wie es in der Arbeit von Specht (1998) beschrieben wurde, nachzuweisen. Das Fehlen eines Stratum corneums ist

eigentlich typisch für die immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT, die für die Herstellung des Epidermisäquivalentes eingesetzt wurde [Boelsma et al., 1999], und konnte mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Oberfläche im Hautmodell auch bestätigt werden. Die Oberfläche der Hautmodelle weist im Vergleich zum Stratum corneum mit seinen abgeflachten und nur in lockerem Kontakt stehenden Zellen eine dichte Zellstruktur mit Mikrovilli auf, die eher mit einem Epithelgewebe vergleichbar ist.

Erstaunlich ist allerdings, dass die Hautmodelle zum Zeitpunkt dieser Arbeit verglichen mit den früheren Untersuchungen für den Arzneistoff Ibuprofensäure aus Ibutop Creme eine vergleichbare Permeationsbarriere aufweisen, obwohl Specht (1998) ein ausgeprägtes Stratum corneum bei den Hautmodellen nachweisen konnte.

Diese Permeationsbarriere bleibt auch erhalten, wenn die Hautmodelle über eine Zeitspanne von 6 Monaten kryokonserviert wurden, wodurch eine Herstellung im voraus möglich ist, und die Versuchsplanung deutlich vereinfacht werden kann.

### **5.3. Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Permeabilität und die strukturelle Beschaffenheit der humanen Hautmodelle**

Unter Verwendung des Arzneistoffs Ibuprofensäure aus Ibutop Creme wurden weitere Permeationsuntersuchungen zur Charakterisierung der Hautmodelle durchgeführt, um u.a. die Bedeutung der Epidermisschicht für die Permeationsbarriere der Hautmodelle ermitteln zu können. Bei Ibuprofensäure handelt es sich um ein lipophiles Molekül mit einem Molekulargewicht von 204.

Obwohl im mikroskopischen Bild deutlich zu erkennen war, dass erst nach 4 Wochen Kultivierungszeit eine mehrschichtige differenzierte Epidermis entstanden ist, zeigten die Permeationsuntersuchungen in Abständen von einer Woche nach Beginn der Kultivierung keine Unterschiede in der Permeationsbarriere der Hautmodelle. Dies Ergebnis erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da die Epidermis und insbesondere das Stratum corneum die Barrierefunktion der Haut ausmachen. Während der Kultivierungszeit kam es zwar insbesondere in der 2. Hälfte zur deutlichen Zunahme der Epidermisschicht, aber während der 1. Hälfte traten gravierende strukturelle Veränderungen im Dermisäquivalent des Hautmodells auf. Diese waren bereits makroskopisch zu erkennen. Mit Hilfe von oszillationsrheologischen Untersuchungen war eine genau Messung der elastischen und viskosen Module und deren Veränderungen im Hautmodell während der Kultivierung möglich. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls in Abständen von einer Woche

durchgeführt und zeigten, dass erst nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen die Kontraktion des Dermisäquivalentes vollständig abgeschlossen ist. Es kam zwischen der zweiten und dritten Woche der Kultivierung zu einem sprunghaften Anstieg des elastischen und viskosen Moduls, wobei der elastische Modul von Beginn der Kultivierung an deutlich überwog und auch einen größeren Anstieg zu verzeichnen hatte. Ein Einfluss der Epidermis, die in der letzten Woche der Kultivierung an Dicke noch deutlich zunimmt, auf die rheologischen Eigenschaften des Hautmodells war allerdings mit Hilfe dieser Messtechnik nicht zu erkennen. Dies ist insofern überraschend, als in der Literatur beschrieben ist, dass die biomechanischen Eigenschaften der Haut zwar in erster Linie von der Dermis abhängen [Cua et al., 1990; Elsner et al., 1990], aber auch die Epidermis als zäh und elastisch federnd beschrieben wird [Christensen et al., 1977], und dass es durchaus schwer ist die Einflüsse der Epidermis von denjenigen der Dermis zu trennen.

Aufgrund der nicht vollständig abgeschlossenen Kontraktion der Hautmodelle und der submersen Kultivierung in den ersten zwei Wochen ist viel Flüssigkeit aus dem Kulturmedium fest im Dermisäquivalent der Hautmodelle gebunden. Dies bedeutet für die Permeation des Wirkstoffs, dass er eine viel längere Diffusionsstrecke zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment zurücklegen muss als nach vollständig abgeschlossener Kontraktion. Des weiteren besteht durch den hohen Wassergehalt eine sehr hydrophile Barriere für den lipophilen Arzneistoff Ibuprofen. Im Zuge der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze und nach abgeschlossener Kontraktion im Kollagengel sinkt die Menge an Flüssigkeit im Hautmodell, die Dicke nimmt deutlich ab, und die Permeationsbarriere wird hauptsächlich durch die Epidermis bestimmt. Die unterschiedlichen Einflüsse auf die Permeation scheinen einander zu kompensieren, so dass die Permeation des Wirkstoffs in den verschiedenen Kultivierungsstadien des Hautmodells nahezu gleich ist, obwohl erst nach 4 Wochen Kultivierung eine ausgeprägte Epidermis entstanden ist. Eine Kultivierung über die 4 Wochen hinaus wurde nicht untersucht, da jenseits der Kultivierungszeit an der Luft-Medium-Grenze von 14 Tagen keine signifikanten Änderungen des Diffusionswiderstandes stattfinden [Bilbo et al., 1993].

#### **5.4. Einfluss der lipidproduzierenden Sebozytenzelllinie SZ 95 auf den Lipidgehalt und die Permeabilität der Hautmodelle**

Da die Barriere, auch die der artifiziellen Epidermis, in einem hohen Maße von der Anwesenheit und der Integrität der Stratum corneum Lipide abhängig ist, sollte die Barrierefunktion durch die Inkorporation einer lipidproduzierenden Zelllinie beeinflussbar sein.

Mit den klassischen Methoden wie der DSC und Röntgenstrukturanalyse ließen sich keine Lipidstrukturen in den Hautmodellen nachweisen, vermutlich waren die untersuchten Mengen zu gering und die Sensitivität der Messgeräte nicht ausreichend. Deshalb wurde die in den Hautmodellen enthaltene Lipidfraktion extrahiert und mittels HPTLC näher untersucht. Erschwerend bei der Interpretation der Ergebnisse war, dass die Menge an extrahierten Lipiden in zwei Versuchsreihen deutlich differierte, innerhalb einer Versuchsreihe nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Lipiden ermittelt wurden und so insgesamt nur Tendenzen zu erkennen waren. Zwar konnten in unseren Hautmodellen die typischen Hautlipide nachgewiesen werden, die vermutlich durch die enthaltenen Fibroblasten und Keratinozyten gebildet wurden, da sowohl in der Kollagenmatrix wie auch im Rohkollagen weniger Lipide enthalten waren. Eine weitere Steigerung der Lipidmenge durch die Sebozytenzelllinie SZ 95 konnte jedoch mit Hilfe dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

In einer dritten Versuchsreihe konnte bei einer getrennten Untersuchung von Dermis- und Epidermisäquivalent unserer Hautmodelle mit 20,8 % bezogen auf das Trockengewicht eine doppelt so hohe Menge an Lipiden aus dem Epidermisäquivalent extrahiert werden wie aus dem Dermisäquivalent (11,2 %). Dies zeigt, dass sich wie bei den In-vivo-Verhältnissen die Lipide unseres Hautmodells hauptsächlich in der Epidermis befinden. Der Vergleich mit In-vivo-Verhältnissen und anderen kommerziellen Epidermismodellen ist allerdings erschwert, da in der Literatur zwischen den Lipiden der Epidermis weiter differenziert wurde [Ponec et al., 2000]. Leider war mit der uns zur Verfügung stehenden Methode keine weitere Lipiddifferenzierung möglich.

In den Permeationsuntersuchungen mit Ibuprofensäure aus Ibutop Creme ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Hautmodellen mit und ohne inkorporierte Sebozyten. Die Fähigkeit dieser Zelllinie Lipide wie Squalen, Wachsester, freie Fettsäuren und Triglyceride zu synthetisieren [Zouboulis et al., 1999] scheint keinen Einfluss auf die Permeationsbarriere der Hautmodelle auszuüben, wie es in der Arbeit von Specht (1998)



durch eine gezielte Fettsäuresupplementierung des Mediums erreicht werden konnte. Durch die Änderung des Fettsäureangebotes zeigten die HaCaT-Zellen eine veränderte Lipidbiosynthese, die sich in einer allgemeinen Verbesserung der Lipidmatrix im Zuge einer Steigerung der Lipidbildung oder einer Synthese wichtiger Ceramide äußerte. Der Permeationskoeffizient konnte durch diese Supplementierung für eine wässrige Ibuprofen-Lysinat Lösung um die Hälfte gesenkt werden [Specht, 1998].

### **5.5. Vergleich der Permeationsbarriere der Hautmodelle mit kommerziellen Vollhaut- und Epidermismodellen**

Um die Permeationsbarriere unserer Hautmodelle besser beurteilen und einordnen zu können, wurden kommerzielle Hautmodelle zum Vergleich herangezogen. Als weiteres Vollhautmodell diente AST-2000 der Firma Cellsystems und als reine Epidermismodelle die aus nativen Keratinozyten aufgebauten Modelle der Firmen Skinethic und MatTek, die sich nur durch das Filtermaterial, auf denen die Keratinozyten kultiviert wurden, unterscheiden.

Alle Hautmodelle sind geeignet den Transport von Substanzen in und durch die Haut zu untersuchen, und leisten so einen wichtigen Beitrag in Forschung und Entwicklung der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie. Als Alternative werden häufig Human- und Tierhäute eingesetzt, wobei zu bedenken ist, dass menschliche Haut nur begrenzt zur Verfügung steht und Tierhaut aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit zur menschlichen Haut und aus Tierschutzgründen gravierende Nachteile aufweist. So sorgte eine EU Regulation (76/768/EEC, Feb. 2003) dafür, dass ab 2009 der Einsatz von Tierhäuten für toxikologische Studien kosmetischer Produkte verboten sein wird. Aus diesem Grund wird schon seit langer Zeit in verschiedenen Studien der Einsatz von kommerziellen Hautmodellen im Vergleich zu Tierhäuten und exzidiert humaner Haut (meist Spalthaut oder exzidiertes humanes Stratum corneum) insbesondere im Hinblick auf die Permeationsbarriere [Asbill et al., 2000; Lotte et al., 2002; Schäfer-Korting et al., 2006] und die Eignung für die Testung irritativer Substanzen [Cannon et al., 1994; Faller et al., 2002] untersucht.

In dieser Arbeit sollte die Vergleichbarkeit der Permeationsbarrieren zweier Vollhautmodelle mit zwei Epidermismodellen für den Arzneistoff Ibuprofensäure aus Ibutop Creme untersucht werden. Unser Hautmodell und das Modell AST-2000 sind aufgrund des vorhandenen Dermisäquivalents der Haut in vivo ähnlicher und könnten in Permeationsstudien gegenüber den reinen Epidermismodellen von Vorteil sein, da auch die Dermis als Permeationsbarriere eine wichtige Rolle spielt. Insbesondere für lipophile Substanzen kann durch reine

Epidermismodelle ein verbesserter Transport vorgetäuscht werden als es in der Haut der Fall wäre, da ohne Dermis die in vivo vorhandene effektive Barriere für lipophile Substanzen fehlt. Durch Vollhautmodelle kann dieses Problem minimiert werden, allerdings bleiben weitere Nachteile vorhanden [Brain et al., 1998], da die Dermis in vitro nicht direkt durch die Blutbahn mit Nährstoffen versorgt wird, kann der Arzneistoff, der in die Dermis gelangt, nicht schnell in die Blutbahn übergehen und abtransportiert werden. Des weiteren wird durch die wässrige Umgebung der Dermis in vitro die Permeation lipophiler Substanzen verlangsamt, so dass dermatomisierte Haut oder exzidiertes Stratum corneum den Hautmodellen insbesondere für lipophile Substanzen vorgezogen werden sollten [Brain et al., 1998]. Bei unserem Modellarzneistoff Ibuprofen handelt es sich um ein kleines Molekül mit lipophilen Eigenschaften. Erfreulicherweise zeigten unser Hautmodell und das AST-2000 eine vergleichbare Permeationsbarriere für Ibuprofen. Die unterschiedlichen Keratinozyten (native und immortalisierte), die für die Bildung der Epidermis eingesetzt wurden, sind also in der Lage auf einem Dermisäquivalent aus inkorporierten Fibroblasten in einem Kollagengel eine vergleichbare Permeationsbarriere zu entwickeln. Diese fällt jedoch deutlich geringer aus als die Barriere der beiden Epidermismodelle, die ebenso untereinander vergleichbare Ergebnisse lieferten. Daraus lässt sich schließen, dass die reinen Epidermismodelle eine effektivere Permeationsbarriere in Form des Stratum corneums ausbilden als die beiden Vollhautmodelle. In der Literatur sind beide Epidermismodelle hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung gut untersucht und zeigen in den Lipidklassen und Lipidmengen eine Vergleichbarkeit zur nativen Epidermis. Allerdings sind bei den Modellen geringere Konzentrationen an freien Fettsäuren und hydrophilen Ceramiden als in vivo zu finden, so dass es zusammen mit der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer Hyperproliferation der Epidermiszellen kommt [Ponec et al., 2000 and 2002]. Bei unserem Hautmodell konnte nur eine gewisse Ähnlichkeit zur Situation in vivo gefunden werden, und da kein ausgeprägtes Stratum corneum nachweisbar war, muss von einer geringeren Barriere wahrscheinlich in Zusammenhang mit einem reduzierten Anteil an Lipiden ausgegangen werden. Beim AST-2000 ist in der Produkt- und Anwendungsinformation beschrieben, dass eine physiologische Lipidverteilung gut nachweisbar ist. Unsere Untersuchung zeigte jedoch, dass der Arzneistoff schneller durch die Epidermis der Vollhautmodelle gelangt, so dass bei beiden Modellen von einer nicht ausreichend ausgeprägten Epidermis ausgegangen werden kann. Die Qualität der hydrophilen Barriere, in Form des in den Vollhautmodellen enthaltenen Dermisäquivalents, scheint für lipophile Substanzen wie Ibuprofensäure hier ebenfalls nur gering ausgeprägt zu sein.

Beim Vergleich der erhaltenen Permeationskoeffizienten mit den Daten durch exzidiertes Stratum corneum [Stoye, 1997] ergibt sich somit für die Vollhautmodelle der Faktor 20 und für die Epidermismodelle der Faktor 10.

Seit 2004 ist von der Firma Cellsystems auch ein Epidermismodell kommerziell erhältlich, das EST-1000, das hinsichtlich der Lipide besser untersucht ist und statt des AST-2000 für Permeations- und Absorptionsstudien eingesetzt werden soll. Für dieses Modell konnte in Studien gezeigt werden, dass es ebenso zur Aufklärung umfangreicher toxikologischer und pharmakologischer Fragestellungen (Irritation, Sensibilisierung) eingesetzt werden kann [Hoffmann et al., 2005].

Im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [Schmook et al., 2001; Zghoul et al., 2001; Dreher et al., 2002] zeigt auch das hier erhaltene Ergebnis, dass unser Hautmodell, das Vollhautmodell AST-2000 sowie die kommerziell erhältlichen Epidermismodelle eine deutlich geringere Permeationsbarriere als die Haut in vivo aufweisen. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung und Testung neuer Produkte in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie stellt die Verbesserung der bestehenden Hautmodelle momentan noch eine wichtige Herausforderung dar.

## **5.6. Einfluss der Grundlage auf die Permeation von Clindamycin durch exzidiertes Stratum corneum und humane Hautmodelle**

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Permeationsbarriere der Hautmodelle ist der Einfluss der Grundlage auf das Permeationsverhalten des Arzneistoffes unberücksichtigt geblieben. Dies sollte mit den vergleichenden Untersuchungen zum Permeationsverhalten von Clindamycindihydrogenphosphat ( $M_r$  505) aus zwei verschiedenen Grundlagen an unserem Hautmodell und exzidiertem humanen Stratum corneum nachgeholt werden.

Wagner et al. (2001) konnten für verschiedene Arzneistoffe zeigen, dass die Permeation durch humanes Stratum corneum und hitzeseparierte Epidermis vergleichbare Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen zur Permeation von Clindamycin durch humane Hautmodelle mit der Permeation durch exzidiertes humanes Stratum corneum verglichen.

Wie erwartet permeierte das hydrophile Clindamycindihydrogenphosphat sowohl aus der Lösung als auch aus der Gelformulierung besser durch das Hautmodell als durch exzidiertes humanes Stratum corneum. Betrachtet man die beiden verschiedenen Formulierungen, so ergibt sich für die Permeation die gleiche Reihenfolge, Clindamycin permeiert sowohl durch

das Hautmodell als auch durch exzidiertes Stratum corneum schneller aus der Lösung als aus dem Gel. Auffällig ist, dass die Verbesserung der Permeation durch den Einfluss der Grundlage bei beiden Barrieren unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dies liegt daran, dass der in der Lösung enthaltene Isopropylalkohol mit den Lipiden des Stratum corneums interagiert, dadurch die Strukturen aufgeweitet werden und die Löslichkeit für den Arzneistoff erhöht wird. Daraus resultiert ein Anstieg des Arzneistofffluxes [Bennett et al., 1985], der aufgrund der geringeren Menge an Lipiden im Hautmodell weniger ausgeprägt ist als beim Stratum corneum. Deshalb ergibt sich mit dem Faktor 3,6 eine deutliche Permeationssteigerung beim Stratum corneum für den Wirkstoff aus der Lösung gegenüber dem Gel, während die Permeationssteigerung beim Hautmodell mit 1,4 eher unbedeutend ist.

Betrachtet man die verbesserte Permeation für den Wirkstoff aus den beiden verschiedenen Grundlagen, so permeiert Clindamycin aus dem Gel 125-mal und aus der Lösung 48-mal schneller durch die Hautmodelle als durch Stratum corneum. Vergleicht man die Faktoren mit der Permeation von Ibuprofen, so bildet das Hautmodell für die hydrophilere Substanz eine deutlich geringere Permeationsbarriere aus. Dies Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von Winkler (2005), der für die hydrophilen Wirkstoffe 5-Aminolävulinsäure-HCl und den 5-Aminolävulinsäure-*n*-butylester ebenso feststellte, dass sie das Hautmodell deutlich schneller durchdringen als das lipophile Ibuprofen. Des weiteren stellte Winkler (2005) fest, dass sich durch die Wahl der Grundlage noch einmal eine Permeationssteigerung beim Hautmodell in Bezug auf exzidiertes Stratum corneum erreichen lässt. Die untersuchten Arzneistoffe permeierten aus einer hydrophilen Grundlage sogar um den Faktor 860- bis ca. 2800-mal schneller als aus einer lipophilen Grundlage.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass der Faktor zwischen den Permeationskoeffizienten (ermittelt durch Hautmodelle und exzidiertes Stratum corneum) nicht nur von den physiko-chemischen Eigenschaften der untersuchten Arzneistoffe abhängt sondern ebenfalls stark von der Grundlage beeinflusst wird. Der Unterschied zwischen den Barriereigenschaften von Stratum corneum und den Hautmodellen ist bei hydrophilen Substanzen und hydrophilen Vehikeln deutlich größer als bei lipophilen Wirkstoffen und Formulierungen. Der lipophile Charakter des Stratum corneums hat eine bessere Barrierefunktion für hydrophile Substanzen als für lipophile zur Folge. Daher wirkt sich die größere Durchlässigkeit der Hautmodelle, die durch eine geringere Menge an Lipiden bedingt sein kann, stärker auf hydrophile als auf lipophile Substanzen aus. Zudem wird die

Permeationsrate durch die Affinität der Formulierung zum Wirkstoff sowie zur Permeationsbarriere beeinflusst.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Schmook et al. (2001) zu anderen Hautmodellen kann das Stratum corneum nicht vollständig durch die Hautmodelle ersetzt werden. Es ist aber gut geeignet um vergleichende Untersuchungen durchzuführen und die Dauer von Permeationsexperimenten zu reduzieren. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Hautmodelle ist die geringe Schwankung der Permeationsdaten und die Herstellung in nahezu uneingeschränktem Umfang mit gleichbleibenden Barriereigenschaften.

## **6. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es das bestehende organotypische Hautmodell, aufgebaut aus humanen dermalen Fibroblasten in einem Kollagengel und der immortalisierten HaCaT-Zelllinie als Epidermisäquivalent, weiterführend zu charakterisieren und dessen Eignung für den Einsatz in Permeationsstudien zu belegen. Des weiteren sollte versucht werden, die Lipidzusammensetzung mit der von nativer Haut zu vergleichen, und durch die Inkorporation der lipidproduzierenden Sebozytenzelllinie SZ 95 im Hautmodell die Permeationsbarriere zu verbessern. Inwiefern die Barriere des Hautmodells mit kommerziell erhältlichen Epidermis- und Vollhautmodellen verglichen werden kann, und wie sich das Permeationsverhalten von Arzneistoffen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften und aus verschiedenen Grundlagen durch die Hautmodelle mit exzidiertem humanem Stratum corneum vergleichen lässt, sollte ebenfalls untersucht werden.

Zu Beginn war es unerlässlich die 3 verschiedenen Zelllinien (Fibroblasten, Keratinozyten und Sebozyten) hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und ihrer Morphologie zu untersuchen. Nachdem die humanen dermalen Fibroblasten und die HaCaT-Zelllinie sogar ein verbessertes Wachstum als zu einem früheren Zeitpunkt [Specht, 1998] zeigten, und auch die Sebozytenzelllinie SZ 95 erfolgreich in Kultur genommen wurde, konnte mit dem Aufbau des Hautmodells und einer weiterführenden Charakterisierung begonnen werden.

Eine Kultivierungszeit der Hautmodelle von 4 Wochen stellte sich bei den durchgeführten Untersuchungen als optimal heraus. Im histologischen Schnittpräparat war zwar nach 3 Wochen Kultivierungszeit eine mehrschichtige Epidermis zu erkennen, aber erst nach einer weiteren Woche Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze kam es zu einer Differenzierung der Epidermis, mit einer für HaCaT-Zellen typischen Morphologie. In Einklang mit der Literatur war in dieser Arbeit im histologischen Schnittpräparat und mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Hautmodelloberfläche keine vollständige Stratifizierung der Epidermis nachzuweisen. Allerdings bildeten die Hautmodelle dennoch wie in früheren Untersuchungen eine vergleichbare Permeationsbarriere für den lipophilen Arzneistoff Ibuprofensäure aus Ibutop Creme aus. Bei einer kürzeren Kultivierung zeigte sich zwar auch eine Permeationsbarriere für den Arzneistoff, allerdings nicht in Form einer ausgeprägten Epidermis sondern vielmehr durch das hydrophile Dermisäquivalent. Erst nach 3 Wochen Kultivierung und vollständiger Kontraktion nahm die Qualität der Barriere, die für lipophile Substanzen eine entscheidende Rolle spielt, ab, da die zuvor gebundene Flüssigkeit frei wird, und dadurch die Dicke der Hautmodelle und somit die Diffusionsbarriere reduziert wird.

Verglichen mit exzidiertem humanen Stratum corneum war die Permeationsbarriere der Hautmodelle, die in hohem Maße von der Anwesenheit und Integrität der Stratum corneum Lipide abhängig ist, deutlich geringer ausgeprägt. Nach Extraktion der in den Hautmodellen enthaltenen Lipidfraktion und Untersuchung ihrer Zusammensetzung, konnten typische Stratum corneum Lipide nachgewiesen werden. Nach einer Trennung von Dermis- und Epidermisäquivalent konnte gezeigt werden, dass in der Epidermis des Hautmodells die Gesamtlipidmenge doppelt so hoch wie in der Dermis ist. Allerdings war ein Nachweis der für die Barriereeigenschaft der Epidermis wichtigen Ceramide und freien Fettsäuren nur mit geringen Anteilen möglich, und es zeigten sich im Lipidprofil kaum Unterschiede zwischen dem Dermis- und Epidermisäquivalent. Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung durch die Inkorporation der lipidproduzierenden Sebozytenzelllinie SZ 95 war mit Hilfe dieser Methode nicht zu erkennen. Da sich in Permeationsuntersuchungen für Ibuprofensäure auch kein verändertes Permeationsprofil ergab, ist es nicht zur erwarteten Verbesserung der Permeationsbarriere der Hautmodelle durch die Sebozyten gekommen.

Dennoch ist unser Hautmodell durchaus mit kommerziellen Hautmodellen hinsichtlich der Permeationsbarriere vergleichbar. Insbesondere mit dem Vollhautmodell AST-2000 weist es eine vergleichbare Permeationsbarriere für Ibuprofensäure auf. Beide Modelle zeigten allerdings eine um den Faktor 2 verbesserte Permeation als die beiden kommerziellen Epidermismodelle Epiderm und Skinethic, die eine deutlich ausgeprägte Barrierequalität in Form eines ausgeprägten Stratum corneums besitzen und ähnliche Lipidprofile aufweisen wie native Epidermis.

Aufgrund des nur gering ausgeprägten Stratum corneums und des relativ niedrigen Lipidgehalts in der Epidermis können mit Hilfe der Hautmodelle Veränderungen im Permeationsverhalten von Arzneistoffen in Abhängigkeit der Grundlage nicht exakt erfasst werden. Dies konnte in einer Permeationsstudie mit Clindamycindihydrogenphosphat aus zwei verschiedenen Grundlagen insofern gezeigt werden, als der Einfluss des permeationsverbessernden Isopropylalkohols in der Lösung sowohl beim Hautmodell als auch beim Stratum corneum zu erkennen war, allerdings bei den Hautmodellen deutlich geringer ausgeprägt war als beim Stratum corneum. Somit ergeben sich in Abhängigkeit des Arzneistoffs und der Grundlage unterschiedliche Faktoren zwischen den verschiedenen Permeationsbarrieren, wobei die Hautmodelle immer eine höhere Durchlässigkeit zeigen. Positiv zu bewerten ist, dass mit Hilfe der Hautmodelle die Dauer von Permeationsexperimenten deutlich verkürzt werden kann, keine Abhängigkeit von Hautpenden besteht, und die Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen erfolgen

können. Ein Einsatz in frühen Stadien der Produktentwicklung zur Abschätzung des Permeationsverhaltens verschiedener Substanzen erscheint daher sinnvoll.



## 7. Literaturverzeichnis

**Alberts B** (1995) Molekularbiologie der Zelle, Wiley-VCH, Weinheim

**Asbill C, Kim N, El-Kattan A, Creek K, Wertz P, Michniak B** (2000) Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies, *Pharm Res* 17: 1092-1097

**Auerbach R, Grobstein C** (1958) Inductive interaction of embryotic tissues after dissociation and reaggregation, *Exp Cell Res* 15: 384-397

**Bargel H-J, Schulze G (Hrsg.)** (1994) Werkstoffkunde, 6. überarb. Aufl., VDI Verlag, Düsseldorf

**Barry BW** (1983) Dermatological formulations, Marcel Dekker, INC.

**Barry BW** (1987) Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J Controlled Release* 6: 85-97

**Barry BW** (1991) Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement, *J Controlled Release* 15: 237-248

**Bauer KH, Frömmig KH, Führer C** (2002) Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2002, nach Elias PM (1981) Epidermal lipids, membranes and keratinisation, *Int J Dermatol* 20 (1): 1-19

**Bell E, Ivarsson B, Merrill C** (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (3): 1274-1278

**Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T** (1981) Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science* 211: 1052-105

**Bennett SL, Barry BW, Woodford R** (1985) Optimization of bioavailability of topical steroids: non-occluded penetration enhancers under thermodynamic control, *J Pharm Pharmacol*, 37 (5): 298-304

**Bilbo PR, Nolte CJM, Oleson MA, Mason VS, Parenteau NL** (1993) Skin in complex culture: the transition from "culture" phenotype to organotypic phenotype, *J Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.* 12: 183-196

**Boelsma E, Verhoeven MCH, Ponc M** (1999) Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT), *J Invest Dermatol* 112: 489-498

**Boozchaloo S, Reichl S** (1996) Charakterisierung verschiedener Kollagene durch Gelelektrophorese, Seminararbeit, Technische Universität Braunschweig

- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N** (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J Cell Biology* 106: 761-771
- Bouwstra JA, de Vries MA, Gooris GS, Bras W, Brussee J, Ponc M** (1991a) Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier, *J Controlled Release* 15: 209-220
- Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Bras W** (1991b) Structural investigations of human stratum corneum by Small-Angle X-Ray scattering, *J Invest Dermatol* 97 (6): 1005-1012
- Bouwstra JA, Gooris GS, Salomons-de Vries MA, van der Spek JA, Bras W** (1992) Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration : A wide-angle X-Ray diffraction study, *Int J Pharm* 84: 205-216
- Bouwstra JA, Gooris GS, Bras W** (1993) New insights in the lipid structure of the skin barrier, in: Gurny R, Teuber A, *Dermal and transdermal drug delivery*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Bowdn GT, Hohneck G, Fusenig NE** (1977) DNA excision repair in ultraviolet-irradiated normal and malignantly transformed mouse epidermal cell cultures, *Cancer Res* 37: 1611-1617
- Brain KB, Walters KA, Watkinson AC** (1998) Investigation of permeation in vitro, in: Roberts MS, Walter KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment* 91, in: Swabrick J, *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker Inc. New York
- Cannon CL, Neal PJ, Southee JA, Kubilius J, Klausner M** (1994) New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxicol in vitro* 8 (4): 889-891
- Carrel A** (1912) On the permanent life of tissues outside the organism, *J Exp Med* 15: 516-528
- Christensen MS, Hargens CW, Nacht S, Gans EH** (1977) Viscoelastic properties of intact human skin: instrumentation, hydration effects and the contribution of the stratum corneum, *J Invest Dermatol* 69: 282-286
- Cornwell PA, Barry BW, Stoddart CP, Bouwstra JA** (1994) Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: effects of hydration and terpene enhancer treatment, *J Pharm Pharmacol* 46: 938-950
- Cox RP** ed (1974) *Cell Communication*, Wiley, New York
- Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI** (1990) Elastic properties of human skin: Relation to age, sex, and anatomical region, *Arch Dermatol Res* 282: 283 - 288

- Daly CH, Odland GF** (1979), Age-related changes in the mechanical properties of human skin, *J Invest Dermatol* 73: 84-87
- Dreher F, Patouillet C, Fouchard F, Zanini M, Messenger A, Roguet R, Cottin M, Leclaire J, Benech-Kieffer F** (2002) Improvement of the experimental setup to assess cutaneous bioavailability on human skin models: dynamic protokoll, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15 Suppl 1: 31-39
- Edwards C, Marks R** (1995) Evaluation of biomechanical properties of human skin, *Clin Dermatol* 13 (4): 375- 380
- Elbert K** (1998) Alveolare Epithelzellkultursysteme als in vitro Modell für die pulmonale Absorption von Arzneistoffen, Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M** (2002) Effect of fibroblasts on epidermal regeneration, *Br J Dermatol* 147: 230-243
- Elias PM** (1981) Epidermal lipids, membranes and keratinization, *Int J Dermatol* 20 (1): 1-19
- Elias PM** (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *Int J Dermatol* 80 (6 Suppl.): 44s-49s
- Elias PM** (1990) The importance of epidermal lipids for the stratum corneum, in: Osborne, DW, Amann AH (Hrsg.), *Topical drug delivery formulations*, Marcel Dekker Inc. New York: 13-28
- Elias PM, Leventhal ME** (1979) Intercellular volume changes and cell surface area expansion during cornification, *Clin Res* 27: 525
- Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI** (1990) Mechanical properties of human forearm and vulvar skin, *Br J Dermatol* 122: 607- 614
- Ernesi AM, Swiderek M, Gay R** (1992) Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture, *Skin Pharmacol* 5: 146-153
- Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R** (2002) Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics, *Toxicol in vitro* 16: 557-571
- Flaxman BA, Lutzner ML, van Scott EJ** (1967) Cell maturation and tissue organization in epithelial outgrowths from skin and buccal mucosa in vitro, *J Invest Dermatol* 59: 322-332
- Flynn GL, Yalkowsky SH, Roseman TJ** (1974) Mass transport phenomena and models: theoretical concepts, *J Pharm Sci* 63 (4): 479-510
- Flynn GL** (1989) Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence, in: Bronaugh RL, Maibach HI (Hrsg.) *Percutaneous absorption*, Marcel Dekker Inc., New York: 27-51

- Forslind B** (1994) Domain mosaic model of the skin barrier, *Acta Derm Venereol* 74: 1-6
- Franke H, Galla H, Beuckmann CT** (2000) Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro, *Brain Res Protoc* 5: 248-256
- Franz TJ** (1975) Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data, *J Invest Dermatol* 64: 190-195
- Freshney RI** (1990) Tierische Zellkultur: ein Methoden-Handbuch, de Gruyter, Berlin, New York
- Freshney RI, Freshney MG** (1996) Culture of immortalized Cells, Wiley-Liss, New York
- Fritsch P** (1985) in: Zenker W (Hrsg.), Benninghoff „Anatomie“ Bd. 3, Urban & Schwarzenberg Verlag München
- Fritsch P** (1990) Dermatologie, Springer Verlag
- Fujita T, Tanaka K, Tokunaga J** (1986) Zellen und Gewebe- Ein REM-Atlas für Mediziner und Biologen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Fusenig NE, Breitkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp P, Herzmann E, Bohnert A, Pölmann J, Rasch C, Schütz S, Hornung J** (1982) Epidermal cell differentiation and malignant transformation in culture, *Cancer Forum* 6: 209-240
- Garson JC, Doucet J, Leveque JL, Tsoucaris G** (1991) Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction, *J Invest Dermatol* 96 (1): 43-49
- Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A** (1992) The skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxicol in Vitro* 6: 303-315
- Geißlinger G, Dietzel K, Bezler H, Nuernberg B, Brune K** (1989) Therapeutically relevant differences in the pharmacokinetical and pharmaceutical behavior of ibuprofen lysinate as compared to ibuprofen acid, *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 27 (7): 324-328
- Geißlinger G** (1996) Stereoselektive Pharmakologie von 2-Aryl-propionsäuren, Pharmazeutischlebensmittelchemisches Kolloquium der Universität Münster
- Ghiani AA, Grobe GM** (2005) Charakterisierung von Kollagen aus Rattenschwanzsehnen als Matrix für in-vitro Zellkultursysteme, Wahlpflichtarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Golden GM, Guzek DB, Kennedy AH, Mckie JE, Potts RO** (1987a) Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties, *Biochemistry* 26 (8): 2382-2388
- Golden GM, Mcki JE, Potts RO** (1987b) Role of stratum corneum lipids fluidity in transdermal drug flux, *J Pharm Sci* 76 (1): 25-28

- Goodman M, Barry BW** (1986) Action of skin permeation enhancers azone, oleic acid and decylmethyl sulfoxide: Permeation and DSC studies, *J Pharm Pharmacol* 38 (Suppl.): 71P
- Graeve T, Fuchs H** (1999) Dreidimensionale zelluläre Testsysteme. *Bioforum* 22: 178-180
- Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, Hakim M, Song Y, Watsky MA** (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines, *Science* 286: 2169-2172
- Gruenert DC, Finkbeier WE, Widdicombe JH** (1995) Culture and transformation of human airway epithelial cells, *Am J Physiol* 268 (3 Pt 1): L347-360
- Gütt S** (1998) Rheologische in vivo Untersuchungen an der menschlichen Haut mit nicht-invasiven Verfahren, Dissertation, Hamburg
- Guy R, Hadgraft J** (1988) Physicochemical aspects of percutaneous penetration an its enhancement, *Pharm Res* 5 (12): 753-758
- Halprin KM, Lueder M, Fusenig NE** (1979) Growth and differentiation of postembryotic mouse epidermal cells in explant culture, *J Invest Dermatol* 72: 88-98
- Harrison RG** (1907) Observation on the living developing nerve fibre, *Proc Soc Exp Biol Med* 4: 140-143
- Hauck G** (1994) Hornschichtlipide: Methoden zu ihrer Bestimmung sowie ihr Einfluss auf die Penetration von Flufenaminsäure in das Stratum Corneum, Dissertation, Universität des Saarlandes
- Hawley-Nelson P, Sullivan JE, Kung M, Hennings H, Yuspa SH** (1980) Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture, *J Invest Dermatol* 75: 176-182
- Hedberg CL, Wertz PW, Downing DT** (1988) The nonpolar lipids of pig epidermis, *J Invest Derm* 90 (2): 225-229
- Herrmann K, Trinkkeller U** (1999) Dermatologie und medizinische Kosmetik, Springer, Berlin (u.a.)
- Hidalgo IJ, Li J** (1996) Carrier-mediated transport and efflux mechanism in caco-2 cells, *Adv Drug Deliv Rev* 22: 53-66
- Hisoire G, Bucks D** (1997) An unexpected finding in percutaneous absorption observed between haired and hairless guinea pig, *J Pharm Sci* 86 (3): 398-400
- Hoffmann J, Heisler E, Karpinski S, Losse J, Thomas D, Siefken W, Ahr HJ, Vohr HW, Fuchs HW** (2005) Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) - A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing, *Toxicol in Vitro* 19: 925-929.
- Holbrook KA, Hennings HJ** (1983) Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review, *J Invest Dermatol* 81: 11s-24s

- Hsu S, Jamieson AM, Blackwell J** (1994) Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology* 31 (1): 21 – 36
- Hueber F, Wepierre J, Schaefer H** (1992) Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: In vivo study in the hairless rat, *Skin Pharmacol* 5: 99-107
- Illel B, Schaefer H** (1988) Transfollicular percutaneous absorption; skin model for quantitative studies, *Acta Derm Venerol* 68: 426-430
- Imakova G, Abe A, Jin K, Hagaki Y, Kawahima M, Hidano A** (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin?, *J Invest Dermatol* 96 (4): 523-526
- Jacobsen J, van Deurs B, Pedersen M, Rassing MR** (1995) TR146 cell grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties and permeability, *Int J Pharm* 125:165-184
- Jenkinson DM, Elder HY, Montgomery I, Moss VA** (1985) Comparative studies of the ultrastructure of the sebaceous gland, *Tiss Cell* 17: 683-698
- Kaiser DG, Van Giessen, Reischer RJ, Wechter WJ** (1976) Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans. *J Pharm Sci* 65: 269–273
- Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF** (1995) Antimicrobial Agents: Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, and Miscellaneous Antibacterial Agents, In: Hardman JG, Limbird, LE (Hrsg) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York 9: 1123-1153
- Kealey T, Lee CM, Thody, AJ, Coaker T** (1986) The isolation of human sebaceous glands and apocrine sweat glands by shearing, *Br J Dermatol* 114: 181-188
- Kellum RE** (1966) Isolation of human sebaceous glands, *Arch Dermatol* 93: 610-612
- Kietzmann M, Löscher W, Arens D, Maass P, Lubach D** (1993) The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate, *J Pharmacol Toxicol Methods* 30: 75-84.
- Kligman AM, Christophers E** (1963) Preparation of isolated sheets of human stratum corneum, *Arch Dermatol* 88: 702-705
- Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT** (1997) Paracellular diffusion in Caco-2-cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size, *J Pharm Sci* 86: 1105-1110

- Köhler G, Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256: 496-497
- Lampe ML, Williams AC, Elias J** (1983) Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation, *J Lipid Res*, 24. 131-140
- Landmann L** (1991) Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharmazie in unserer Zeit* 20 (4): 155-163
- Lauer AC, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner N** (1995) Transfollicular drug delivery, *Pharm Res* 12 (2): 179-186
- Lehr CM** (2002) Cell culture models of biological barriers, Taylor & Francis, London, New York
- Levine B, Caplan YH** (1985) Simultaneous liquid-chromatographic determination of five nonsteroidal anti-inflammatory drugs in plasma or blood, *Clin Chem* 31 (2): 346-347
- Lieckfeld R, Lee G** (1994) Measuring the diffusional pathlength and area within membranes of excised human stratum corneum, *J Pharm Pharmacol* 47: 26-29
- Lippold BC** (1981) Wirkstoffresorption aus Dermatika, *Deutsche Apotheker Zeitung* 121: 2585
- Loth H** (1986) Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen I, *Acta Pharm Technol* 32 (2): 109-114
- Lotte C, Patouillet C, Zanini M, Messenger A, Roguet R** (2002) Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15 Suppl 1: 18-30
- Matoltsy A, Matoltsy MN** (1970) The chemical nature of keratohyalin granules of the epidermis, *J Cell Biol* 47: 593-603
- McEvoy GK** (1992) AHFS Drug Information. American Society of Hospital Pharmacists Inc, Bethesda (USA): 2363
- Minami Y, Sugihara H, Oono S** (1993) Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen matrix culture, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2316-2324
- Müller-Goymann CC, Alberg U** (1999) Modified water containing hydrophilic ointment with suspended hydrocorticone-21-acetat– the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vitro percutaneous penetration, *Eur J Pharm Biopharm* 47 (2): 139-143
- Mutschler E** (1996) Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

- Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT** (1996) The use of surfactans to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system, *Pharm Res* 13: 528-534
- Netzlaff, F, Lehr CM, Wertz PW, Schäfer UF** (2005) The human epidermis models EpiSkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> and EpiDerm<sup>®</sup>: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity and substance transport, *Eur J Pharm Biopharm* 60: 167-178
- Neubert R, Schmalfuß U, Wohlrab W, Huschka C** (1996) Arzneistoffpenetration in die Haut und deren Modulation, *Pharm Ztg* 141 (17): 11-23
- Neubert R, Wohlrab W, Marsch W** (2001) *Dermatopharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Nikkari T** (1974) Comparative chemistry of sebum, *J Invest Dermatol* 62: 257-267
- Odland GF** (1960) A submicroscopic granular component in human epidermis, *J Invest Dermatol* 34: 11-15
- Parenteau N** (1994) Skin equivalents, In: Leigh I, Watt F (Hrsg.), *Keratinocyte methods* Cambridge University Press
- Plewig G, Christopher E, Braun-Falco O** (1971) Proliferative cells in the human sebaceous gland, *Acta dermatovener* 51:413-422
- Ponec M, Wauben-Penris PJJ, Burger A, Kempenaar J, Boddè HE** (1990) Nitroglycerin and sucrose permeability as quality markers for reconstructed human epidermis, *Skin Pharmacol* 3: 126-135
- Ponec M** (1992) In vitro cultured skin cells as alternative to animals for skin irritancy screening, *Int J Cosmet Sci* 14: 245-264
- Ponec M, Weerheim A, Kempenaar A, Mulder GS, Gooris J, Bouwstra J, Mommaas AM** (1997) The formation of competent barrier lipids on reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C, *J Invest Dermatol* 109 (3): 348-355
- Ponec M, Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J, Mommaas M** (2000) Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models, *Int J Pharm* 203: 211-225
- Ponec M, Boelsma E, Gibbs S, Mommaas M** (2002) Characterisation of reconstructed skin models, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15 Suppl 1: 4-17
- Potts RO, Francoeur ML** (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability, *J Invest Dermatol* 96 (4): 495-499
- Prunieras M, Regnier M, Woodley D** (1983) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface, *J Invest Dermatol* 81 (Suppl 1): 28s-33s



- Purslow PP, Wess TJ, Hukins DW** (1998) Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *J Exp Biol* 201: 135 – 142
- Refai H** (2001) Dilution of semisolid preparations- Studies on the parameter affecting hydrocortisone release and permeation through excised human stratum corneum with emphasis on influence of dilution, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Refai H, Müller-Goymann CC** (2002) The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum, *Eur J Pharm Biopharm* 54 (2): 143-150
- Regnier M, Caron D, Reichert U, Schaefer H** (1992) Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro barrier function of the skin, *Skin Pharmacol* 5: 49-56
- Reichl S, Müller-Goymann CC** (2001) Entwicklung eines organotypischen Korneakonstruktes als ein in vitro Modell für Permeationsstudien, *Ophthalmologie* 98: 853-858
- Reichl S, Müller-Goymann CC** (2003) The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride, *Int J Pharm* 250: 191-201
- Reichl S** (2003) Entwicklung porciner und humaner cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Rheinwald JG, Green H** (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* 6: 331-344
- Robert M, Noel-Hudson MS, Font J, Auberry M, Wepierre J** (1994) Influence of fibroblasts on epidermization by keratinocytes on synthetic porous membrane (insert) at the air liquid interface, *Cell Biol Toxicol* 10: 361-365
- Rosdy M, Clauss LC** (1990) Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface, *J Invest Dermatol* 95 (4): 409-414
- Rosdy M, Pisani A, Ortonne JP** (1993) Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors, *Br J Dermatol* 129: 227-234
- Rumsfield JA, West DP** (1992) Common skin disorders: Acne and psoriasis; In DiPiro JT et al., *Pharmacotherapy, a Pathophysiologic Approach*, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier, Amsterdam:1387-1403
- Ryle CM, Breitzkreuz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE** (1989) Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones, *Differentiation* 40 (1): 42-54

- Sasaki N, Odajima S** (1996) Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. *J Biomech* 29 (5): 655–658
- Schäfer-Korting M, Bock U, Gamer A, Haberland A, Haltner-Ukomadu E, Kaca M, Kamp H, Kietzmann M, Korting HC, Krächter HU, Lehr CM, Liebsch M, Mehling A, Netzlaff F, Niedorf N, Rübhelke MK, Schäfer U, Schmidt E, Schreiber S, Schröder KR, Spielmann H, Vuia A** (2006) Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study, *ATLA*, 34: 283-294
- Schmook FP, Meingasser JG, Billich A** (2001) Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in vitro percutaneous absorption, *Int J Pharm* 215: 51-56
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T** (1997) The use of an in vitro cornea for predicting ocular toxicity, *In vitro toxicol* 10: 309-318
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T** (1999) Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types, *In vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 515-526
- Schreiber S, Mahmoud A, Vuia A, Rubbelke MK, Schmidt E, Schaller M, Kandarova H, Haberland A, Schafer UF, Bock U, Korting HC, Liebsch M, Schäfer-Korting M** (2005) Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies, *Toxicol In Vitro* 19 (6): 813-822
- Schurer NY, Elias, PM** (1991) The biochemistry and function of stratum corneum lipids, *Adv Lipid Res* 24: 27-56
- Schürer N, Köhne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G** (1993) Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes, *Exp Dermatol* 2: 179-185
- Serban G, Edelberg R, Garcia M, Hambridge A** (1986) Intraepidermal sweat levels and the viscoelastic properties of human skin, *Bioeng Skin* 2: 134
- Sheehan-Dare RA, Papworth-Smith J, Cunliffe WJ** (1990) A double-blind comparison of topical clindamycin and oral minocyclin in the treatment of acne vulgaris, *Acta Derm Venerol* 70: 534-537
- Simon GA, Maibach HI** (2000) The pig as an experimental animal model of pervutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations- an overview, *Skin Pharmacol* 13: 229-234
- Small DM** (1986) Handbook of lipid research, Vol 4: The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids, Plenum Press, New York

- Specht C** (1998) Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen, Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Specht C, Stoye I, Müller-Goymann CC** (1998) Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies, *Eur J Pharm Biopharm* 46: 273-278
- Spoo JW, Riviere JE** (1995) Chloramphenicol, Macrolides, Lincosamides, Fluoroquinolones and miscellaneous Antibiotics. In: Adams (Hrsg.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, Iowa State University Press, Ames (USA) 820-855
- Stewart ME, Downing DT** (1991) Chemistry and function of mammalian sebaceous lipids, *Adv Lipid Res* 24: 263-301
- Stingl G, Gazze-Stingl L, Aberer W, Wolff K** (1981) Antigen presentation by murine epidermal Langerhans cells and its alteration by ultraviolet B light, *B J Immunol* 127: 1707-1713
- Stoye I** (1997) Permeabilitätsveränderung von humanem Stratum corneum nach Applikation nichtsteroidaler Antirheumatika in verschiedenen kolloidalen Trägersystemen, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Strauss JS, Downing DT, Ebling JF, Stewart ME** (1991) Sebaceous glands, In: La G (Hrsg.) *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the skin*, New York, Oxford University Press, 712-740
- Suhonen T, Pasonen-Seppänen S, Kirjavainen M, Tammi M, Tammi R, Urtti A** (2003) Epidermal cell culture model derived from rat keratinocytes with permeability characteristics comparable to human cadaver skin, *Eur J Pharm Sci* 20: 107-113
- Tegtmeyer S** (2000) Kultivierung und Charakterisierung von bovinen in vitro Cornea-Modellen für Permeationsuntersuchungen, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Tegtmeyer S, Papantoniou I, Müller-Goymann** (2001) Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochlorid, *Eur J Pharm Biopharm* 51: 119-125
- Theobald F** (1998) In-vitro Methoden zur biopharmazeutischen Qualitätsprüfung von Dermatika unter Berücksichtigung der Lipidzusammensetzung des Stratum Corneum, Dissertation, Universität des Saarlandes
- Triglia D, Braa SS, Yonan C, Naughton GK** (1991) In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model, *In Vitro Cell. Devel. Biol.* 27A: 234-239

- Vogel HG** (1981) Directional variations of mechanical parameters in rat skin depending on maturation and age. *J Invest Dermatol* 76: 493 – 497
- Wagner H, Kosta KH, Lehr CM, Schäfer U** (2001) Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents, *J Control Release* 75 (3): 283-295
- Wassermann K, Müller-Goymann CC** (2000a) Standardized cultivation of artificial skin construct for drug permeation studies, *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333 (Suppl 1): 34
- Wassermann K, Müller-Goymann CC** (2000b) Artificial skin construct for permeation studies- influence of prior nitrogen freezing, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333 (Suppl. 2): 17
- Welsch U** (1997) Farbatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen, Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore
- Wertz PW, Downing DT** (1989) Integral lipids of mamalian hail, *Comp Biochem Physiol B* 92 (4): 759-761
- Wertz PW** (1996) The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects, *Adv Drug Delivery Rev* 18: 283-294
- Wilhelmi BJ, Blackwell SJ, Mancoll JS, Phillips LG** (1998) Creep vs. stretch: a review of the viscoelastic properties of skin. *Ann Plast Surg* 41 (2): 215 - 219
- Williams ML, Elias PM** (1987) The extracellular matrix of stratum corneum: Role of lipids in normal and pathological function, *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3: 95-122
- Williams ML, Hincenbergs M, Holbrook KA** (1988) Skin lipid content during early fetal dvelopment, *J Invest Dermatol* 91: 263-268
- Winkler A** (2005) Untersuchungen zur Permeation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) und ALA-*n*-butylester durch exzidiertes humanes Stratum corneum und organotypisches Hautkonstrukt, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Xia L, Zouboulis CC, Detmar, M, Mayer-da-Silva A, Stadtler R, Orfanos CE** (1989) Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland derived cells as an in vitro model, *J Invest Dermatol* 93: 315-321
- Yannas SH, Burke JF** (1980) Design if an artificial skin. I. Basic design principles, *J Biomed Mater Res* 14: 65-81
- Yuspa SH, Koehler B, Kulesz-Martin M, Hennings H** (1981) Clonal growth of mouse epidermal cells in medium with reduced calcium concentration, *J Invest Dermatol* 76: 144-146

- Zghoul N, Fuchs R, Lehr CM, Schäfer UF** (2001) Reconstructed skin equivalents for assessing percutaneous drug absorption from pharmaceutical formulations, *ALTEX*, 18 (2): 103-106
- Ziegenmeyer J** (1989) Transdermale Applikation von Arzneistoffen, *Pharm Ztg* 18: 9-15
- Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen, BR, Parenteau NL** (1994) Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction, *Exp Cell Res* 214: 621-633
- Zouboulis CC** (1992) Sebocytes culture: how they can improve our understanding of diseases of the sebaceous glands, *Retinoids today and tomorrow* 26 (Suppl.): 6-12
- Zouboulis CC, Krieter A, Gollnick H, Mischke D, Orfanos CE** (1994) Progressive differentiation of human sebocytes in vitro is characterized by increasing cell size and altering antigen expression and is regulated by culture duration and retinoids, *Exp Dermatol* 3: 151-160
- Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H, Seltmann H, Fritsch M, Hornemann S, Rühl R, Chen W, Nau H, Orfanos CE** (1998) The human sebocyte culture model provides new insight into development and management of seborrhoea and acne, *Dermatology* 196: 21-31
- Zouboulis CC, Seltmann H, Netzel H, Orfanos CE** (1999) Establishment and characterisation of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ 95), *J Invest Dermatol* 113: 1011-1020